

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA DE INGENIEROS DE TELECOMUNICACIÓN



GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DIGITALIZACIÓN Y
ANÁLISIS DE IMÁGENES DE MICROSCOPIA PARA EL
DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS MEDIANTE
INTELIGENCIA COLECTIVA Y GAMIFICACIÓN.**

MARÍA POSTIGO CAMPS

Tutor: Miguel Ángel Luengo Oroz;

Tribunal: María Jesús Ledesma Carbayo, Andrés Santos Lleó, Manuel Sierra Castañer;



Comunidad de Madrid



B

I

T

Biomedical Image Technology



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA DE INGENIEROS DE TELECOMUNICACIÓN



GRADO EN INGENIERÍA BIOMÉDICA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE DIGITALIZACIÓN Y
ANÁLISIS DE IMÁGENES DE MICROSCOPIA PARA EL
DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS MEDIANTE
INTELIGENCIA COLECTIVA Y GAMIFICACIÓN.**

MARÍA POSTIGO CAMPS

Tutor: Miguel Ángel Luengo Oroz;

Tribunal: María Jesús Ledesma Carbayo, Andrés Santos Lleó, Manuel Sierra Castañer;



Comunidad de Madrid



B

I

T

Biomedical Image Technology



Gracias a Miguel Ángel Luengo Oroz, tutor de este Trabajo de Fin Grado, por confiar en mí, darme responsabilidades, voz y voto cuando sentía que todo se me quedaba grande. Gracias por darme la oportunidad de trabajar mano a mano con médicos en entidades tan llamativas como el Instituto de Salud Carlos III y el Hospital Clínico San Carlos. Miguel, a pesar de que ‘nadie dijo que fuera a ser fácil’ he aprendido que merece la pena soñar en grande.

Gracias a María Jesús Ledesma Carbayo por el tiempo, interés y dedicación que has puesto en cada una de las cuestiones que te he consultado. Gracias Chus por tus buenos consejos.

Gracias al equipo SpotLab, Sara, Dani, Álvaro y Jero, por tantos buenos momentos. No sé si voy a volver a encontrar unos compañeros de trabajo tan profesionales y divertidos como vosotros.

RESUMEN

Contexto

La tuberculosis es la segunda enfermedad infecciosa que causa más muertes en todo el mundo. El método de diagnóstico más extendido es la identificación y conteo de bacilos *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de esputo. Dicho proceso se realiza por microscopía óptica, y puede requerir hasta 20 minutos de un técnico microscopista. Los requerimientos de tiempo y personal cualificado son dos barreras para el diagnóstico de esta enfermedad en países en vías de desarrollo. Con esta motivación surge TuberSpot, un videojuego en el que voluntarios no-expertos deben encontrar los bacilos existentes en una muestra digitalizada. Un algoritmo de inteligencia artificial integra los resultados de varios jugadores para dar un resultado fiable.

Objetivos

En este Trabajo de Fin de Grado se diseña, implementa y evalúa un sistema de digitalización de muestras de esputo basado en telefonía móvil e integrable con TuberSpot. Además, se proponen técnicas de procesamiento de imagen para el control de calidad del análisis y se implementa un mecanismo para evaluar la eficiencia de la inteligencia colectiva y la gamificación en este contexto.

Métodos

El sistema de adquisición propuesto utiliza *smartphones*, adaptadores móvil-microscopio y una aplicación Android. El protocolo de adquisición se ha diseñado conforme a un estudio realizado con personal médico cualificado.

El control de calidad se basa en la inserción de bacilos simulados en las imágenes. Para la evaluación de eficiencia de TuberSpot se crea, en colaboración con médicos especialistas, un repositorio de imágenes en las que posición y número de bacilos quedan registrados.

Resultados

Implementación de un sistema y protocolo de digitalización de muestras de esputo susceptibles a tuberculosis, utilizando telefonía móvil y adaptadores móvil-microscopio impresos en 3D por menos de un euro. La adecuación del sistema se ha podido demostrar tanto en centros hospitalarios en España como en Mozambique. Extensión del sistema a muestras de sangre susceptibles de malaria.

Creación de los primeros repositorios de muestras reales de esputo y sangre digitalizadas con *smartphones*, así como, el primer repositorio de imágenes de esputo con bacilos simulados, analizadas y anotadas por expertos.

Integración del sistema en TuberSpot y evaluación de la adecuación de las imágenes en más de 13.000 partidas con aproximadamente 1000 jugadores.

Conclusiones

Es posible adquirir imágenes de microscopía de muestras de sangre y esputo con un adaptador móvil-microscopio y un *smartphone*, sin necesidad de conocimientos técnicos. El sistema propuesto tiene un coste mínimo en comparación con otras cámaras usadas específicamente en este contexto y posee una calidad de imagen suficiente para identificar y cuantificar *M. tuberculosis* en las imágenes. La evaluación del sistema comparando los bacilos identificados por médicos y los resultados integrados de los jugadores, demuestran que el sistema de inteligencia colectiva posee una sensibilidad del 90% asociada a un 88% de precisión.

ABSTRACT

Background

Tuberculosis is the second infectious disease that causes more deaths worldwide. Its most widespread method of diagnosis is the identification and counting of *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in sputum samples. This process is performed by light microscopy, and can take up to 20 minutes of an expert microscopist's time. Time and qualified staff requirements are two barriers for the diagnosis of this disease in developing countries. TuberSpot has been developed to overcome this challenge. TuberSpot is a videogame in which non-expert volunteers must find existing bacilli in a digitized sample; an artificial intelligence algorithm integrates the results of several players to give a reliable result.

Objective

This work proposes a design, implementation and evaluation of a scanning system for sputum samples based on mobile telephony and integrated with TuberSpot. In addition, image processing techniques are proposed for quality control analysis and a mechanism to evaluate the efficiency of collective intelligence and gamification in this context is implemented.

Methods

The proposed scanning system uses smartphones, mobile-microscope adapters and an Android application. The scanning protocol was developed according to a study carried out with qualified medical personnel.

Quality control is based on the insertion of simulated bacilli on the acquired images. For the evaluation of TuberSpot efficiency, a repository of images has been created in collaboration with medical specialists, where the position and number of bacilli are recorded.

Results

Implementation of a scanning system and protocol for sputum samples susceptible to tuberculosis, using smartphones and mobile-microscope adapters printed in 3D for less than one euro. The adequacy of the system has been demonstrated both in Spanish hospitals and in Mozambique. The system has been extended to blood samples susceptible to malaria.

Creation of the first repository of real blood and sputum samples scanned with smartphones, as well as the first repository of analyzed and annotated sputum images with bacilli simulated.

System integration with TuberSpot and evaluation of the adequacy of the images in more than 13,000 gameplays with approximately 1,000 players.

Conclusions

It is possible to acquire optical microscopy images of blood and sputum samples with a mobile-microscope adapter and a smartphone, without any technical knowledge. The system proposed has a minimal cost compared to other cameras used specifically in this context and has sufficient image quality to identify and quantify *M. tuberculosis* in the images. The evaluation of the system comparing the bacilli identified by doctors and the integrated results of players, shows that the system of collective intelligence has a sensitivity of 90% associated with 88% of accuracy.

Palabras clave: Tuberculosis, Malaria, Adaptadores móvil-microscopio, Digitalización muestras, Repositorio de imágenes Telediagnóstico, Crowdsourcing, Gamificación,

Keywords: Tuberculosis, Malaria, Smartphone microscope adapters, Smears digitalization, Smears database, Telediagnosis, Crowdsourcing, Gamification.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | IV |
| ABSTRACT | V |
| INDICE..... | VII |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. CONTEXTO | 1 |
| 1.2. OBJETIVOS | 3 |
| 2. ANTECEDENTES | 4 |
| 2.1. TUBERCULOSIS | 4 |
| 2.2. ADAPTADORES MÓVIL-MICROSCOPIO..... | 8 |
| 3. DESCRIPCIÓN DE LA SOLUCIÓN PROPUESTA..... | 11 |
| 3.1. ARQUITECTURA DEL SISTEMA | 11 |
| 3.1.1. ACOPLÉ MÓVIL-MICROSCOPIO..... | 15 |
| 3.1.2. APP PARA LA DIGITALIZACIÓN DE MUESTRAS | 17 |
| Login aplicación | 17 |
| Registro paciente y número de muestra | 17 |
| Digitalización | 18 |
| Envío de imágenes..... | 18 |
| 3.1.3. CONTROL DE CALIDAD DE JUGADORES..... | 19 |
| 3.1.4. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE CROWDSOURCING | 19 |
| Localización de microorganismos | 19 |
| Extracción posiciones microorganismo | 20 |
| 3.2. PROTOCOLO DE DIGITALIZACIÓN..... | 21 |
| 3.2.1. PLANTEAMIENTO | 21 |
| 3.2.2. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 21 |
| 4. RESULTADOS: VALIDACIÓN E INTEGRACIÓN DEL SISTEMA | 24 |
| 4.1. TUBERCULOSIS | 24 |
| 4.1.1. PROTOCOLO DE DIGITALIZACIÓN | 24 |
| 4.1.2. REPOSITORIO DE IMÁGENES | 31 |
| 4.1.3. CONTROL DE CALIDAD DE JUGADORES..... | 32 |
| 4.1.4. REPOSITORIO DE REFENCIA PARA LA EVALUACIÓN DE TUBERSPOT..... | 32 |
| 4.1.5. INTEGRACIÓN Y PRUEBAS DEL SISTEMA PROPUESTO..... | 34 |
| 4.2. MALARIA | 36 |
| 4.2.1. CONTEXTO | 36 |
| 4.2.2. PROTOCOLO DE DIGITALIZACIÓN..... | 37 |
| 4.2.3. REPOSITORIO DE IMÁGENES | 40 |
| 5. TRABAJOS FUTUROS..... | 42 |
| 5.1. MICROSCOPÍA MÓVIL | 42 |
| 6. CONCLUSIONES | 45 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA..... | 46 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONTEXTO

La tuberculosis es una enfermedad prevenible y tratable, reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la segunda causa mundial de mortalidad, después del sida, causada por un agente infeccioso. En 2013, 9 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,5 millones murieron por esta causa [1]. El diagnóstico de la tuberculosis en países con pocos recursos, a diferencia de otras enfermedades, está restringido al análisis de muestras de esputo a través del microscopio.

El diagnóstico por microscopía óptica requiere tiempo y especialistas entrenados en la realización de los análisis. En el caso de la tuberculosis, un técnico microscopista puede tardar hasta 20 minutos en analizar una muestra. Para esta enfermedad de gran incidencia global, no hay suficientes especialistas en aquellas comunidades donde su prevalencia es mayor. A esto hay que sumar, la variabilidad del técnico debida a la fatiga que genera estar largos periodos de tiempo frente al microscopio.

Actualmente, existen varios estudios que validan la calidad y precisión del diagnóstico realizado sobre muestras digitalizadas (*Whole Slide Images*, WSI) en comparación con el diagnóstico rutinario realizado directamente a través del microscopio óptico [2-4]. Sin embargo, no existen aún métodos automáticos de procesamiento de imagen robustos para diagnosticar la tuberculosis [5]. Ante esta situación, se propone TuberSpot [6], un sistema basado en inteligencia colectiva y gamificación para la detección de bacilos ácido-resistentes en muestras de pacientes susceptibles de tuberculosis.

TuberSpot se enmarca dentro del proyecto SpotLab, cuyo objetivo es desarrollar una plataforma de *crowd computing* escalable, ubicua, rápida y barata para el análisis de imágenes médicas que contribuya en procesos de diagnóstico. SpotLab se basa en la idea de que algunos protocolos específicos en el análisis de imágenes, tales como la localización de bacilos alcohol-resistente en muestras de esputo digitalizadas, puede ser rápidamente aprendido por los no especialistas. El sistema de *crowd computing* que propone integra tecnologías de *crowdsourcing*, juegos, inteligencia artificial y teléfonos móviles. Mediante juegos online, voluntarios no pertenecientes al campo médico, analizan muestras digitalizadas. Utilizando inteligencia artificial se combinan los resultados obtenidos por distintos jugadores sobre una imagen, para obtener un resultado de fiabilidad equivalente a la de un técnico microscopista.

En la era digital, hemos presenciado recientemente como la cooperación de ciudadanos on-line puede tener un gran impacto en el estudio científico de la estructura tridimensional de las proteínas [7] o en el estudio de la geometría de redes de neuronas analizada mediante imágenes de microscopía electrónica [8]. SpotLab pretende aprovechar este impacto para colaborar en el diagnóstico de estas enfermedades de gran incidencia global. Su primera iniciativa, ya puesta en marcha, es el juego MalariaSpot [9]. El objetivo de MalariaSpot es que el jugador, durante un minuto, identifique tantos parásitos como pueda en una imagen de una muestra de sangre real. La puntuación del juego se genera comparando las posiciones que selecciona el jugador con las posiciones de los parásitos que ya han sido previamente analizadas

por médicos especialistas. El análisis de los datos de más de 12.000 partidas ha revelado que la fusión de los resultados obtenidos por 22 voluntarios sin experiencia previa o 13 voluntarios entrenados durante un minuto permite obtener un recuento de parásitos perfecto, tan preciso como el de un experto microscopista [10].

TuberSpot, la iniciativa en la que se trabaja ahora, es un proyecto paralelo a MalariaSpot, aplicado al diagnóstico de la tuberculosis. Implementando la red virtual de "cazadores de tuberculosis" se podría realizar el trabajo rutinario de analizar muestras de esputo en todos los lugares y con máxima fiabilidad.

Para que los proyectos SpotLab sean accesibles en regiones de escasos recursos, es necesario que el sistema de adquisición y envío de imágenes sea de mínimo coste y que precise mínimos conocimientos técnicos. El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es el diseño y desarrollo de dicho sistema de digitalización, así como el procesado de imágenes necesario para incorporar las imágenes en MalariaSpot y TuberSpot.

El sistema de adquisición se basa en la telefonía móvil. La usabilidad de los *smartphones* y sus precios cada vez más económicos han permitido su expansión geográfica. Hoy en día existen seis mil millones de líneas de teléfono, el 70% de ellas en países en vías de desarrollo [11]. Las mejoras en las cámaras de los *smartphones*, la capacidad de registro de datos (documentos, imágenes, vídeos, audios, etc.) y la conexión a redes inalámbricas hacen de la telefonía un móvil un potencial interesante para la adquisición y transmisión de imágenes de microscopía.

1.2. OBJETIVOS

El objetivo de este Trabajo de Fin de Grado es el diseño e implementación de un sistema de adquisición de imágenes de microscopía óptica, basado en telefonía móvil. El sistema debe optimizarse para la digitalización de muestras de esputo susceptibles de tuberculosis y debe poder integrarse con TuberSpot. Como segundo objetivo se pretenden diseñar e implementar técnicas de procesamiento de imagen y de análisis de muestras para evaluar la eficiencia de la inteligencia colectiva y la gamificación en este contexto. Estos objetivos se desglosan en los siguientes pasos:

1. Diseño de un protocolo de digitalización. Este protocolo debe verificar la representatividad de las imágenes adquiridas con el teléfono móvil como imágenes válidas para el diagnóstico. Para la optimización del protocolo, se realizará un estudio con personal médico cualificado.
2. Creación de un repositorio de muestras reales de esputo digitalizadas con teléfono móvil. Estas imágenes son las que se incluirán posteriormente en TuberSpot.
3. Inserción de bacilos simulados en las imágenes de esputo. Este procesamiento permite evaluar y monitorizar la eficacia de los jugadores al analizar muestras cuyo número de bacilos es desconocido.
4. Creación de un repositorio de referencia que contenga imágenes de esputo analizadas y clasificadas por médicos. En cada una de estas imágenes quedarán registradas la posición y el número de los bacilos existentes. A este repositorio lo denominaremos *Gold Standard* (GS). La comparación entre las posiciones del GS y de los resultados integrados de los jugadores permite evaluar la eficacia de la inteligencia colectiva y la gamificación para la identificación de *M. tuberculosis* en muestras de esputo.

Dada la posible utilidad del sistema de adquisición que se propone se extenderán los pasos 1 y 2 a muestras de sangre susceptibles de malaria. Otra enfermedad de gran repercusión que cada año posee 198 millones de casos nuevos y 584.000 muertes. [12]

El sistema de adquisición y análisis de imágenes propuesto permite el diagnóstico remoto de enfermedades de gran incidencia global. El sistema utiliza tecnologías portátiles de bajo coste y no precisa personal cualificado. Los repositorios de imágenes que se proponen constituyen la primera colección de imágenes de muestras reales adquiridas con telefonía móvil.

2. ANTECEDENTES

2.1. TUBERCULOSIS

La tuberculosis (TB) es la segunda enfermedad infecciosa, después del VIH, que causa más muertes en todo el mundo. Se calcula que en 2013 contrajeron la enfermedad 9 millones de personas y que 1,5 millones fallecieron por esta causa [1]. *Mycobacterium tuberculosis* es la bacteria responsable de la enfermedad, afecta fundamentalmente a los pulmones pero puede llegar a provocar daños en casi cualquier órgano del sistema, entre ellos los nódulos linfáticos, el sistema nervioso central, el hígado, los huesos y el tracto gastrointestinal.

Mycobacterium tuberculosis puede encontrarse en el cuerpo de forma latente o de forma activa. En el estado latente de la enfermedad no se aprecian los síntomas, no hay evidencia radiológica ni bacteriológica de la infección. Se calcula que una tercera parte de la población mundial posee la bacteria en este estado, en el que no hay posibilidad de transmitir la enfermedad [1]. La tuberculosis en estado activo puede derivarse de la progresión del estado latente o de la evolución directa tras haber sido infectado. Las personas infectadas con el bacilo tuberculoso tienen un riesgo a lo largo de la vida de enfermar de tuberculosis de un 10% [1]. Sin embargo, este riesgo es mucho mayor para las personas cuyo sistema inmunitario está dañado, como ocurre en casos de infección por el VIH, desnutrición o diabetes, o en quienes consumen tabaco y/o drogas.

La bacteria se transmite de persona a persona a través del aire contenida en microgotas de 1-5 micrómetros de diámetro. Estas gotas microscópicas llegan al aire cuando una persona infectada tose, estornuda, escupe o simplemente habla. A lo largo de un año, un enfermo tuberculoso puede infectar a unas 10 a 15 personas por contacto estrecho [1].

Los síntomas de la tuberculosis pulmonar activa son, entre otros, tos recurrente, fiebre, sudores nocturnos, pérdida de peso, dolores torácicos y debilidad. La tuberculosis es curable si se trata. Estimaciones entre los años 2000 y 2013 revelan que se salvaron 37 millones de vidas gracias a diagnósticos y tratamientos eficaces. Sin embargo, dos de cada tres casos no son tratados adecuadamente y mueren [1].

Aunque los casos y muertes por tuberculosis van decayendo de año en año, esta enfermedad posee grandes consecuencias sociales y económicas a nivel mundial. El grupo de edad más afectado por la tuberculosis es el adulto joven pero cualquier persona, independientemente de su edad, se encuentra en riesgo. Concretamente, medio millón de niños con edades entre 0 y 14 años contrajeron la enfermedad en 2013 y cerca de 80.000 murieron por esta causa [1].

La tuberculosis está extendida por todo el planeta (ver figura 1), sin embargo, cerca del 80% de los casos se concentran en 22 países. Son los países en vías de desarrollo los que más sufren las consecuencias de *Mycobacterium tuberculosis*, poseen un 95% de las personas infectadas. En 2013 Asia Sudoriental y regiones del Pacífico Occidental concentraron el 56% de los casos. No obstante, ese mismo año África tuvo la mayor tasa de incidencia con más de 280 casos por 100.000 habitantes [1].

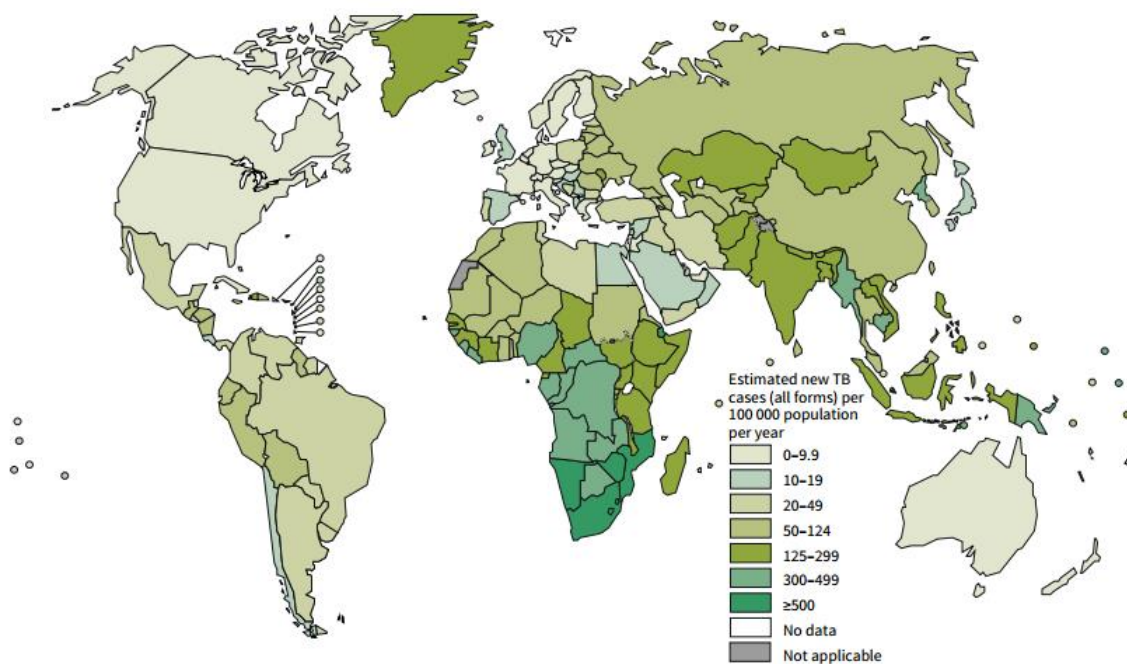


Figura 1. Estimación de la tasa de incidencia de la tuberculosis [1].

Para detener la TB, la OMS ha formulado la estrategia Alto a la Tuberculosis en consonancia con los Objetivos de Desarrollo del Milenio. El objetivo es reducir radicalmente la carga mundial de TB, garantizando que todos los pacientes, se beneficien del acceso universal a un diagnóstico de gran calidad y a un tratamiento centrado en el paciente. La estrategia también apoya el desarrollo de nuevos instrumentos eficaces para prevenir, detectar y tratar la enfermedad. Entre las metas asociadas, la OMS propone eliminar la tuberculosis como problema de salud pública (1 caso por millón de habitantes) para el año 2050, y entre los seis objetivos de la estrategia se encuentra “Apoyar el desarrollo de nuevas herramientas y facilitar su uso efectivo y oportuno” que implica la participación en investigaciones para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico, medicamentos y vacunas [13].

Una de las estrategias epidemiológicas más efectivas para el control de la TB es la identificación temprana de las personas con síntomas respiratorios persistentes. El retraso en el diagnóstico de la TB puede elevar la letalidad, la morbilidad y la frecuencia de secuelas derivadas de la TB crónica. Además, incrementa la incidencia ya que el paciente posee mayor probabilidad de transmitir la infección. El tiempo máximo aceptable para el diagnóstico de la TBP es de tres semanas [14]. Según un estudio de la Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, entre los factores asociados a un diagnóstico tardío, vivir en zonas rurales es el que tiene un mayor peso [15].

El diagnóstico de la tuberculosis, a diferencia de otras enfermedades, está restringido al microscopio en países con pocos recursos [16]. La baciloscopia consiste en el cribado microscópico del esputo, fluido expulsado en la expectoración, con el objetivo de identificar bacilos alcohol-resistente (AFB), grupo de bacterias al que pertenece *Mycobacterium Tuberculosis*. Esta técnica detecta los casos de tuberculosis activa de forma simple y barata, es

el método más eficaz para el diagnóstico de tuberculosis en pacientes que presentan síntomas respiratorios. La baciloscopia también permite evaluar la evolución del paciente y la respuesta a los tratamientos.

Se requieren entre 5.000 y 10.000 bacilos tuberculosos por mililitro de esputo para poder tener un diagnóstico positivo por microscopía. Por lo general, pacientes con tuberculosis pulmonar contienen cantidades suficientemente grandes de bacilos alcohol-resistentes para poder obtener un diagnóstico positivo. La sensibilidad de esta técnica puede mejorar con el cribado de más de un frotis por paciente. Estudios han demostrado que el análisis de dos muestras de esputo detecta en promedio más del 90% de los casos de tuberculosis activa. Un resultado negativo en baciloscopia no excluye el diagnóstico de la tuberculosis. Muestras de mala calidad o indebidamente teñidas pueden ser la causa de resultados negativos. [15]

Para poder visualizar los AFB es necesaria una tinción previa de la muestra con un colorante ácido alcohólico. Existen dos tipos de tinciones válidas para este diagnóstico, Ziehl-Neelsen y el procedimiento con fluorocromo auramina-O que se utiliza con microscopía de fluorescencia.

Los bacilos acidorresistentes tienen entre 1 y 10 μm de largo. Con la coloración Ziehl-Neelsen se observan como bastones delgados, ligeramente curvos, color fucsia, destacándose claramente contra el fondo azul. En las tinciones con auramina los bastones se observan con fluorescencia amarilla, a veces se observan con gránulos o cuentas intensamente coloreados en el interior. Los bacilos pueden presentarse aislados, apareados o agrupados. Es muy difícil distinguir el bacilo de la tuberculosis de otras micobacterias por examen microscópico. Algunas micobacterias que no son *M. tuberculosis* pueden aparecer como bastones muy largos o como bacilococos. [16]

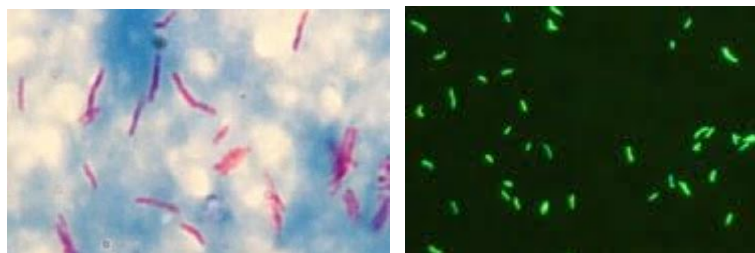


Figura 2. (De izquierda a derecha) Muestra de esputo teñida con Ziehl-Neelsen y muestra de esputo teñida con auramina. (Fuentes: Catálogo online de Biopack y Microscopía óptica de Zeiss)

En la microscopía de fluorescencia se analizan los frotis con objetivos de menor magnificación, 25X o 40X con respecto a los objetivos 100X utilizados en tinciones Ziehl-Neelsen. Al utilizar menores magnificaciones, se observa mayor al mismo tiempo, lo que resulta en un cribado más rápido. Sin embargo, una magnificación más baja conlleva mayor probabilidad de que los artefactos puedan confundirse con bacilos ácido-alcohol resistentes. Por tanto, se recomienda encarecidamente que las estructuras con morfología de bacilo se confirmen con mayores aumentos, y que las muestras fluorocromo-positivas se vuelvan a analizar mediante microscopía de Ziehl-Neelsen. [16]

El número total de campos a examinar depende de si se encuentran bacilos y, en caso afirmativo, de su concentración (ver Tabla 1). El número mínimo de campos analizados para reportar una muestra como negativa son 100.

| Promedio AFB/campo | Número mínimo de campos a observar |
|--------------------|------------------------------------|
| 0 | 100 |
| <1 | 100 |
| 1 - 10 | 50 |
| > 10 | 20 |

Tabla 1. Número mínimo de campos que se deben observar en función del promedio de AFB por campo.

Los campos leídos deben ser campos microscópicos útiles. Se considera ‘campo microscópico útil’ aquel en el que se observan células bronquiales o fibras mucosas, que aparecen teñidas de azul. Los campos sin estos elementos no deben ser considerados para contar el total de campos observados, a menos que contengan AFB.

El informe de resultados sigue un convenio internacional y se realiza en función de la concentración de bacilos en la muestra y de la tinción (ver Tabla 2). Puesto que en el análisis de fluorescencia se analiza una superficie mayor de la muestra, se debe dividir el número de AFB por campo entre 10 si la muestra se ha analizado con un objetivo de 25X o entre 4 si se ha utilizado un objetivo 40X.

| Concentración de AFB | Informe de resultados |
|----------------------|---|
| 0 AFB/100 campos | Negativo |
| 1-3 AFB/100 campos | Insuficiente (Se debe extraer y analizar una nueva muestra) |
| 3-9 AFB/100 campos | <i>Scanty</i> |
| 10-99 AFB/100 campos | +1 |
| 1-10 AFB/1 campo | +2 |
| >10 AFB/1 campo | +3 |

Tabla 2. Informe de resultados de la baciloscopia en muestras Ziehl-Neelsen en función de la concentración de la AFB.

2.2. ADAPTADORES MÓVIL-MICROSCOPIO

La digitalización de imágenes de microscopía se realiza de forma estándar con una cámara acoplada de forma fija al microscopio. Las cámaras digitalizan muestras y almacenan las imágenes en una tarjeta de memoria. Posteriormente, estas imágenes se transmiten a un ordenador para su uso y posible procesamiento. El ordenador, la cámara, los oculares específicos que permiten el acople de la cámara y, en ocasiones, el software para la gestión y manipulación de imágenes suponen una inversión económica. En el sistema de digitalización que se propone, este material se sustituye por un teléfono móvil y un adaptador móvil microscopio.

Los adaptadores móvil microscopio son soportes mecánicos que permiten fijar un teléfono móvil al ocular de un microscopio (ver Figura 3). El precio de los adaptadores se encuentra entre 60 y 100€. A continuación se analizan y comparan tres adaptadores disponibles actualmente en el mercado: Magnifi [18], Skylight [19] y Snapzoom [20].

El adaptador Magnifi está diseñado específicamente para dispositivos iPhone (4, 4S, 5 y 5S). Está formado por dos componentes, una carcasa de plástico policarbonato resistente a los impactos y una montura para el ocular del microscopio. Estas dos piezas son independientes y quedan unidas a bayoneta. Para ajustar la montura a las diferentes dimensiones de los oculares se insertan gomas circulares en el interior de la montura, estas gomas se adquieren al comprar el adaptador. En función del número de gomas que se inserten el adaptador podrá acoplarse a unos oculares u otros, siempre y cuando el diámetro del ocular se encuentre en el rango 25-38 mm.

El adaptador Skylight está diseñado para acoplar una gran variedad de teléfonos a oculares de diferentes tamaños. Skylight está formado por una única pieza con dos partes conectadas, una plataforma que soporta el teléfono y una montura con forma de tubo que se desliza por el ocular. El móvil se fija a la plataforma por dos soportes que ejercen presión sobre él. Las pinzas permiten desplazar el móvil en los ejes X e Y para alinear la lente de la cámara con el ocular. La montura también posee un pequeño rango de movimientos en el eje Z para ajustar el enfoque de la cámara.

El adaptador Snapzoom no es específico para ningún modelo de teléfono, admite cualquier dispositivo cuya anchura sea inferior a 8.9 cm. Al igual que Skylight, el adaptador Snapzoom es una única pieza con libertad de movimientos en los tres ejes que permite alinear la cámara con el ocular. En este caso los soportes de la plataforma que sostienen el teléfono se ajustan con tornillos de metal. La montura, a diferencia de la anteriores, puede acoplarse a un ocular dejando el otro libre o puede acoplarse a los dos oculares simultáneamente aumentando así la estabilidad del adaptador.



Figura 3. Adaptadores móvil microscopio. (De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo) Adaptador Magnifi, adaptador Skylight y adaptador Snapzoom. [21].

Existen otros adaptadores similares a la venta como son PhoneSkopec [22], iScope [23], Meopix [24] y Universal Digiscoping [25].



Figura 4. Adaptadores móvil microscopio. (De izquierda a derecha) Adaptador PhoneSkopec [22], adaptador iScope [23], adaptador Meopix [24], adaptador Universal Digiscoping [25].

A continuación se comparan los adaptadores anteriores en función del tipo de dispositivos móviles que puede soportar el adaptador, el número de oculares al que se acoplar, la sencillez de uso valorada como el tiempo necesario para montar todas las piezas y alinear la cámara con el ocular y la estabilidad del adaptador una vez fijado al ocular.

| Adaptador | Dispositivo móvil que acepta | | | Características | | |
|--------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|------------|-----------|
| | iPhone4/5 sin carcasa | iPhone4/5 con carcasa | Otros <i>smartphones</i> | Oculares a los que se acopla | Usabilidad | Precio |
| Magnifi | Si | No | No | Uno | Alta | \$79.99 |
| Skylight | Si | Si | Si | Uno/Dos | Media | - |
| Snapzoom | Si | Si | Si | Uno/Dos | Media | \$74.95 |
| PhoneSkope | Si | No | Si | Uno | Alta | ~\$85.98* |
| iScope | Si | No | Si | Uno | Media | \$99.95 |
| Meopix | Si | No | Si | Uno | Media | \$71.99* |
| Universal Digiscoping | Si | Si | Si | Uno | Media | 76€ |

Tabla 3. Comparación de adaptadores móvil-microscopio. (*El precio puede variar en función del modelo. Los precios seleccionados corresponden al modelo para iPhone 4/4S adaptable a un rango de microscopios)

Posiblemente, la mayor desventaja de los adaptadores móvil-microscopio es la dificultad para el alineamiento de la cámara con el ocular, tarea necesaria para poder observar correctamente todo el campo de visión. Este proceso es más tedioso en los dispositivos que admiten varios *smartphones*, sin embargo, el tiempo necesario se reduce según se adquieren habilidades de uso y/o si la montura se encuentra ajustada al *smartphone* debido a usos anteriores.

3. DESCRIPCIÓN DE LA SOLUCIÓN PROPUESTA

3.1.ARQUITECTURA DEL SISTEMA

El sistema de análisis de muestras en el que se basa TuberSpot es equivalente al resto proyectos que conforman SpotLab. El sistema hace uso de: un microscopio y un dispositivo móvil para la adquisición de imágenes, de un servidor remoto (*backend*) para el almacenamiento y procesamiento de imágenes e información, y de dispositivos Android o PCs para el acceso al juego. El sistema se rige por seis procesos fundamentales que se describen en la Figura 5.

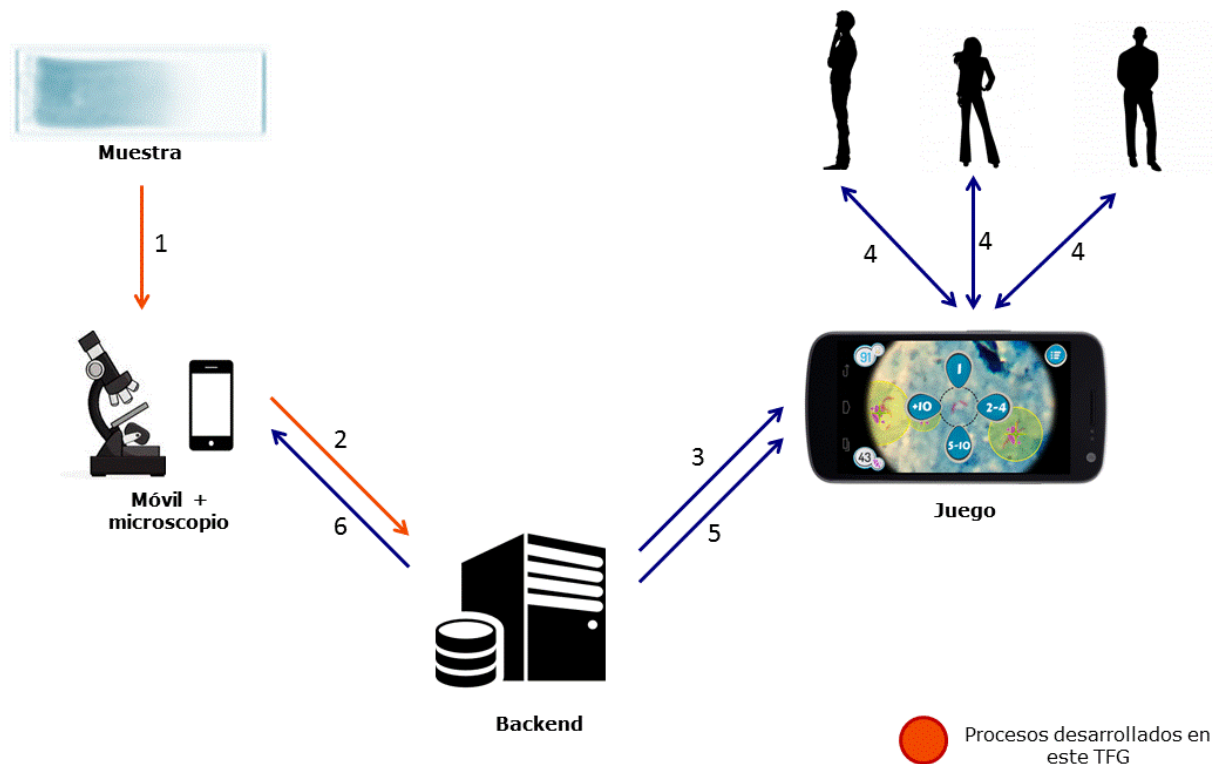


Figura 5. Arquitectura de componentes de TuberSpot

1. Digitalización de la muestra
2. Almacenamiento y procesado de la imagen
3. Incorporación de la imagen en el juego
4. Análisis de la imagen por individuos no-expertos
5. Procesado de los clics y extracción de resultados
6. Envío de resultados

En este Trabajo de Fin de Grado se han desarrollado los procesos de digitalización y procesamiento de imágenes para su posterior almacenamiento y análisis por *crowdsourcing*. La digitalización y el procesamiento son los pasos a realizar desde que la muestra llega al laboratorio y es teñida, de acuerdo con el protocolo médico de la enfermedad a diagnosticar, hasta que es registrada en el servidor para el análisis por *crowdsourcing*.

Para el proceso de digitalización se ha diseñado ‘Microscope’, una aplicación Android que permite digitalizar imágenes, asociarlas al perfil de un paciente y enviarlas al servidor en red. La aplicación cumple los requisitos de anonimización y privacidad de datos del paciente. Microscope está pensada para ser usada por personal no cualificado en aspectos médicos, su diseño es sencillo y usable.

El procesamiento de imágenes que se realiza en el sistema se compone de dos procesos: la inserción de bacilos simulados (*phantoms*) y la creación del *Gold Standard*. Los *phantoms* son imágenes de microorganismos segmentados. Los *phantoms* permiten evaluar y monitorizar la eficacia de los jugadores al analizar muestras cuyo nivel de microorganismos es desconocido. Además, los *phantoms* aumentan la jugabilidad en las imágenes de campos negativos, campos en los que no hay microorganismo.

Para evaluar la eficacia del *crowdsourcing* en el cribado de imágenes de microscopía se ha creado el *Gold Standard*. El *Gold Standard* es un subconjunto de imágenes de muestras reales, en el que médicos microbiólogos han localizado y marcado los microorganismos. La validez del sistema se prueba comparando las posiciones de los microorganismos marcadas por los médicos y los clics de los no expertos en las imágenes del juego. Por otro lado comparar los clics del *Gold Standard* y del juego permite refinar el algoritmo de inteligencia artificial que se utiliza para integrar los clics de varios jugadores y validar el número y la posición de microorganismos en una muestra. Por último, las imágenes del *Gold Standard* se utilizan también como ‘imágenes de entrenamiento’. La fase de entrenamiento del juego está diseñada para que los jugadores aprendan a identificar los microorganismos en las imágenes. En las partidas de entrenamiento el jugador recibe *feedback* en cada *click* que realiza.

En la Figura 6 se han representado las fases de adquisición y procesado de una muestra diferenciando entre: muestra analizada utilizando el protocolo estándar, muestra analizada por el juego, y muestra que forma parte del Gold Standard la cual se utiliza como muestra de entrenamiento.

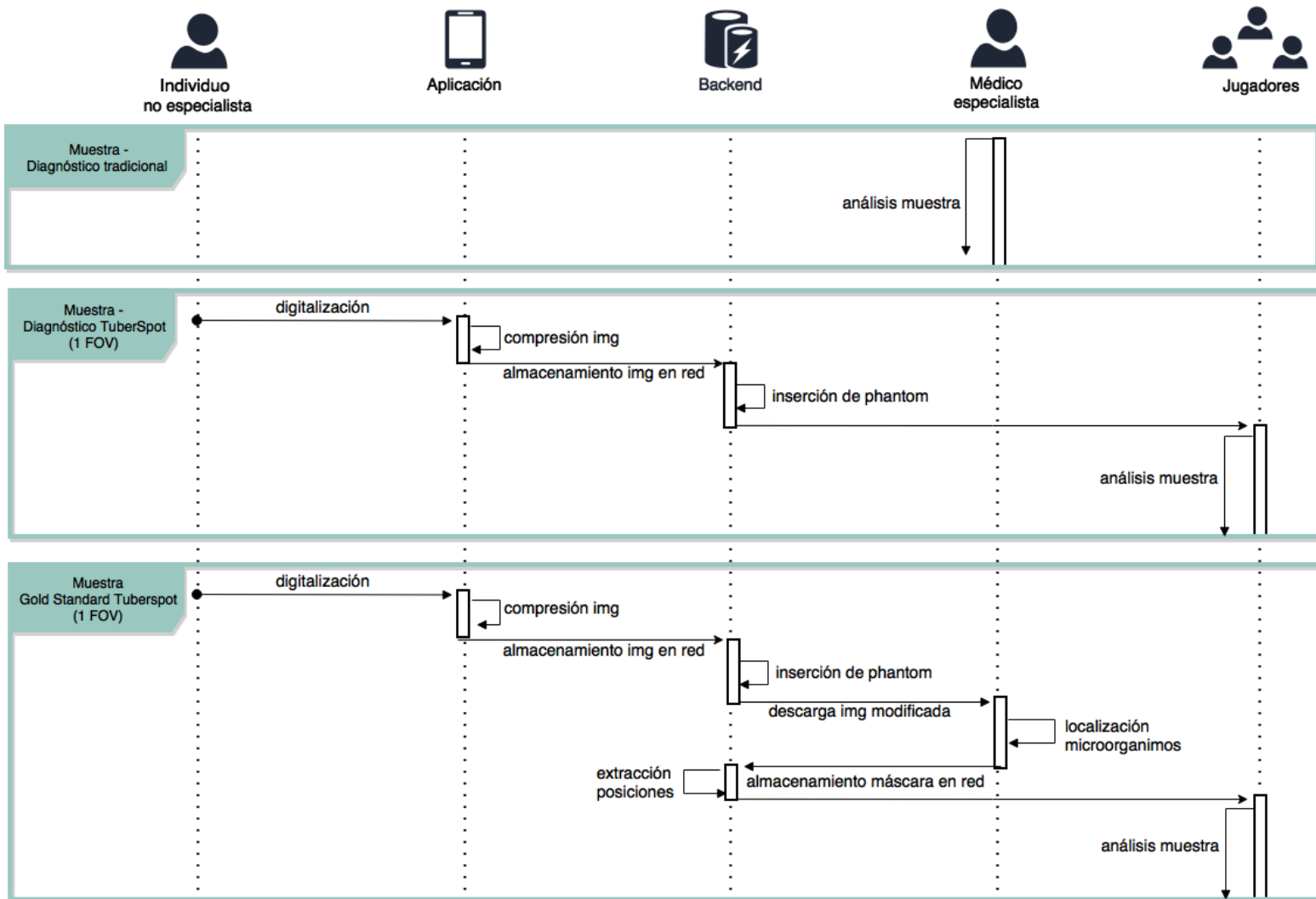


Figura 6. Diagrama de secuencia de las fases de adquisición y procesado de una muestra digitalizada diferenciando entre muestra analizada utilizando el protocolo estándar, muestra analizada por el juego, muestra que forma parte del Gold Standard y que se utiliza como muestra de entrenamiento.

Los procesos de digitalización y adquisición se subdividen en varias actividades. A continuación se presenta un esquema secuencial (ver Figura 7) del conjunto de ellas, así como el usuario que la realiza. En la siguiente figura se diferencia entre los procesos que se han implementado en este Trabajo de Fin de Grado y los procesos en los que se ha colaborado en el diseño.

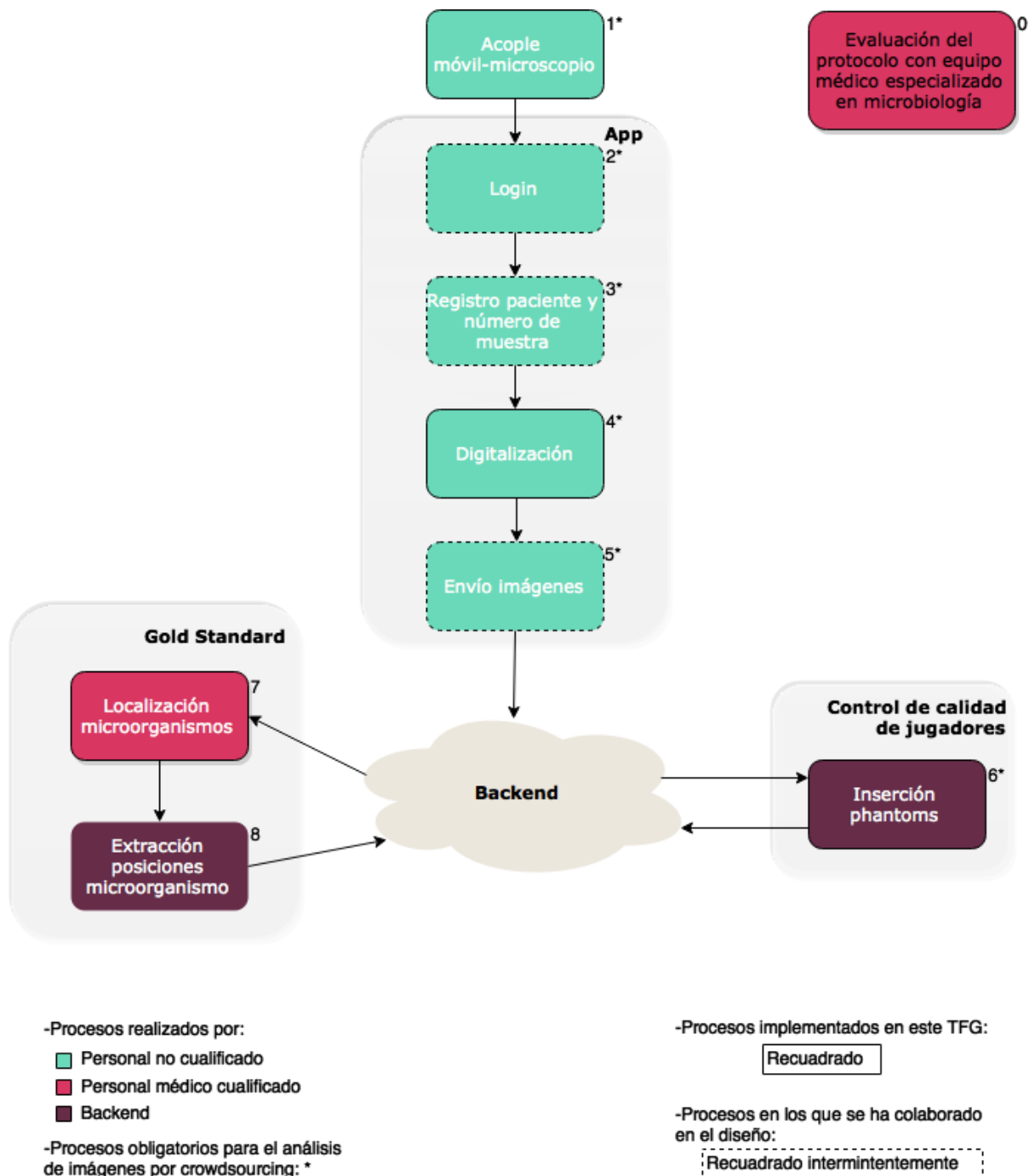


Figura 7. Arquitectura funcional del sistema de adquisición y procesamiento de imágenes.

3.1.1. ACOPLE MÓVIL-MICROSCOPIO

A lo largo del proceso de digitalización se han utilizado y comparado 4 adaptadores móvil-microscopio: Digiscoping, Magnifi y dos adaptadores impresos en 3D.

Digiscoping (ver Figura 8) se distribuye nacionalmente con un precio de 76 euros [26]. Presenta la ventaja de poder adaptarse a gran variedad de teléfonos y microscopios. Su principal inconveniente es ajustar la posición del móvil con respecto al microscopio para poder visualizar correctamente todo el campo de visión tal (ver Figura 9 y 10). En este proceso se debe desplazar el móvil en los 3 ejes utilizando los 4 tornillos de ajuste que dispone. Este proceso puede durar entre 2 y 20 minutos en función de la experiencia y habilidad de la persona que lo realiza.



Figura 8. Adaptador Universal Digiscoping [26]

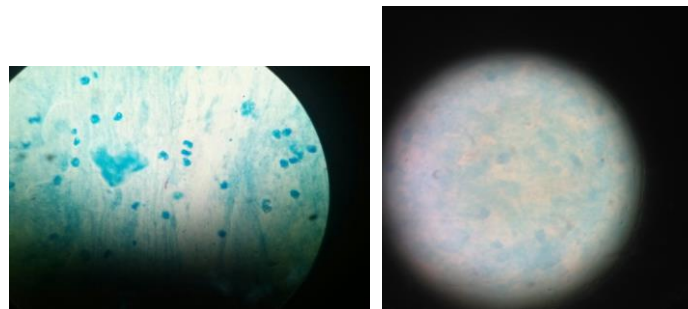


Figura 9. Imágenes con acople incorrecto entre el móvil y el microscopio.

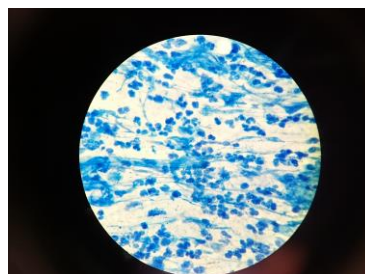


Figura 10. Imagen con acople correcto entre el móvil y el microscopio.

El adaptador Magnifi (ver Figura 11) es más pequeño y fácil de acoplar. Para visualizar correctamente todo el campo de visión, una vez unido el adaptador con el móvil y el

microscopio, sólo hay que ajustar el teléfono con la mano. Se puede utilizar con una gran variedad de microscopios pero cada Magnifi es específico para un modelo determinado de iPhone. En concreto, el modelo que se ha probado es el Magnifi para iPhone 5s. Los adaptadores Magnifi se distribuyen internacionalmente por 79.99 dólares.



Figura 11. Adaptador Magnifi [18].

Los adaptadores impresos en 3D presentan una diferencia fundamental frente al resto de adaptadores, su bajo coste de adquisición. Los únicos gastos son los correspondientes a la adquisición del material y al alquiler de servicios de impresión. Para este proyecto se han impreso dos adaptadores, uno universal y otro para móvil y microscopios determinados, ambos con un coste inferior a un euro (sólo gastos de material).

El material utilizado para ambas impresiones es el PLA (poliácido láctico). El PLA junto con el ABS son los materiales que copan el 95% de las impresiones en 3D [27]. Las ventajas del PLA frente al ABS son las temperaturas de impresión, considerablemente inferiores, la posibilidad de imprimir sin crear una plataforma de impresión y el hecho de ser biodegradable. Sin embargo, en comparación con el ABS, el PLA es más frágil y los procesos de mecanizado, taladrado, pintado y pegado son más complicados [28]. Para previsualizar y determinar los parámetros de la impresión se ha utilizado Cura [29], un software gratuito. Los parámetros de impresión utilizados son los predeterminados del 'medium quality'.

Para la impresión del adaptador universal se utilizó un modelo [30] de Thingiverse [31], repositorio online de diseños digitales tridimensionales. La impresión se ha realizado con una impresora Witbox de bq, en un tiempo entre 4 y 5 horas. En total se han utilizado 18.87 metros de PLA que corresponden a 56 gramos de este material. El modelo escogido es universal por lo que presenta las mismas ventajas e inconvenientes que Digiscoping.



Figura 12. Adaptador universal impreso en 3D [5].

El segundo adaptador es específico para el móvil Sony Xperia Z2 y para el microscopio Zeiss, modelo AX05COP2. El adaptador se compone de dos piezas, una carcasa obtenida de Thingiverse y un cilindro diseñado con Blender [32], un software libre y gratuito para el diseño de objetos y animaciones en 3D. La impresión se realizó con la impresora bq Prusa I3, utilizando 48 gramos de PLA y en un tiempo de 2 horas y 53 minutos.

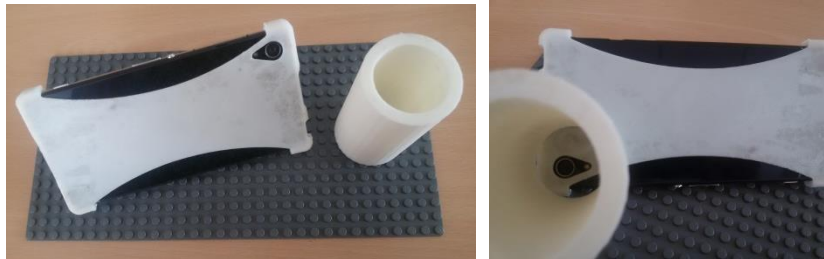


Figura 13. Adaptador impreso en 3D, específico para Sony Xperia Z2 y microscopio Zeiss AX05COP2.

El inconveniente que presenta actualmente la impresión 3d es la falta de precisión. En la impresión del adaptador universal, los agujeros diseñados para introducir los tornillos quedaron ligeramente reducidos. Para poder introducir los tornillos fue necesario un taladro.

3.1.2. APP PARA LA DIGITALIZACIÓN DE MUESTRAS

Login aplicación

Es la primera interfaz de la aplicación. Existen dos posibilidades de inicializar la app, con un usuario ya registrado o registrar un nuevo usuario. En ambos casos es necesario un nombre de usuario y una contraseña para acceder a la aplicación. Cada usuario podrá acceder, editar y visualizar el resultado de los análisis de las imágenes, muestras y pacientes que haya creado. Este hecho es fundamental para mantener la privacidad de los datos del paciente.

Registro paciente y número de muestra

En las entidades hospitalarias los pacientes son identificados con un código. Este código es el que se introduce en la aplicación al registrar un nuevo paciente. Para mantener la anonimización del paciente al enviar la muestra al sistema de *backend* se utiliza el algoritmo unidireccional SHA-256. SHA-256 permite convertir de forma única el id del paciente a un código de 32 dígitos. El código SHA-256 será el que se enviará al sistema y se almacenará en el servidor. La relación id del paciente y código SHA-256 sólo podrá ser visualizada por el usuario de la aplicación que registró al paciente.

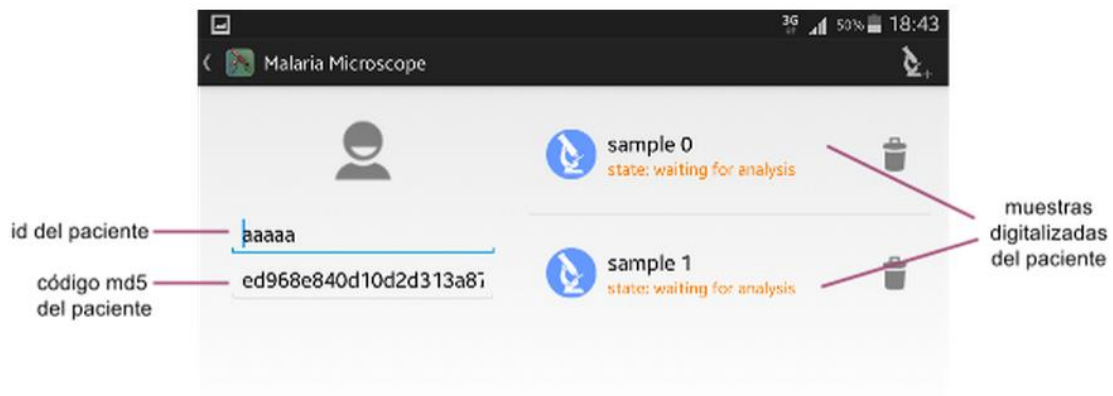


Figura 14. *Screenshot* de la aplicación Microscope. Interfaz con los datos y muestras de un determinado paciente.

Digitalización

Al seleccionar el botón de “Digitalización” se despliega un menú que permite seleccionar la patología a diagnosticar. Actualmente las opciones a elegir son 3: ‘Malaria’, ‘Tuberculosis’, ‘Otros’. Los objetivos de que el usuario realice esta selección son dos, asignar la base de datos en la que se deben almacenar las muestras del paciente (en función de la base de datos, las imágenes serán incorporadas en un juego u otro) y calibrar la cámara con los valores de digitalización óptimos validados en el estudio con médicos especialistas.

El número de imágenes a realizar de cada muestra depende de la patología que se quiera diagnosticar.

Envío de imágenes

Una vez se han digitalizado los campos correspondientes a una muestra y si el móvil posee conexión a Internet, se procede al envío de las imágenes al servidor para que puedan ser incorporadas y analizadas por crowdsourcing.

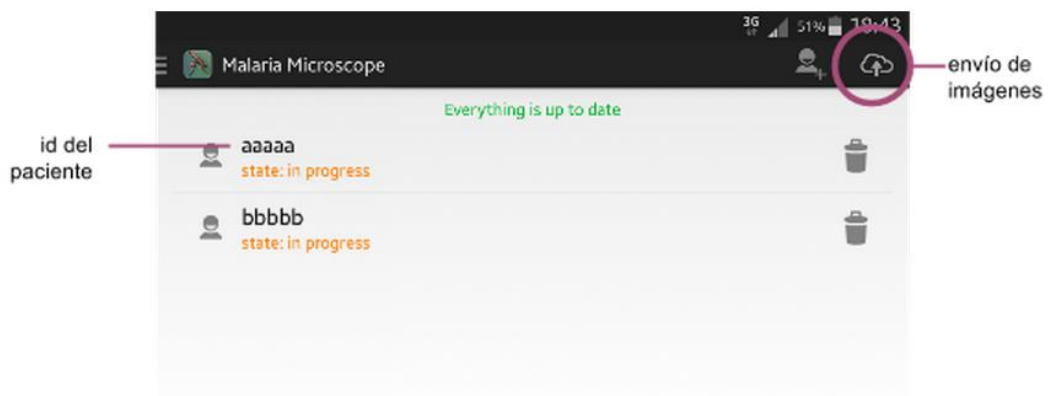


Figura 15. *Screenshot* de la aplicación Microscope. Interfaz con la lista de pacientes registrados.

3.1.3. CONTROL DE CALIDAD DE JUGADORES

La inserción de *phantoms* se divide en dos partes, segmentación del bacilo o parásito y superposición del *phantom* sobre la imagen original. Ambas se pueden realizar con diferentes programas de tratamiento digital de imagen.

La segmentación de *phantoms* puede realizarse manualmente de forma sencilla. Para ello es necesaria una imagen con bacilos o parásitos bien teñidos y definidos, la segmentación de estos microorganismos se realizará eliminando todos los píxeles de la imagen que no correspondan a un determinado microorganismo. En este TFG la segmentación se ha realizado con Paint.net [33], un software gratuito para la edición de gráficos. Las herramientas utilizadas son Selección de un área y Borrador, en ambas se puede definir el tamaño de la herramienta.

La superposición del *phantom* con la imagen, aunque se ha realizado de forma manual, el objetivo es automatizarlo en el *backend*. Una vez almacenados varios modelos de microorganismos se ha utilizado GIMP [34], un programa gratuito y de software libre para la edición de imágenes digitales en forma de mapa de bits. GIMP permite la importación de diferentes imágenes como capas, el desplazamiento de una capa sobre otra y exportación de una imagen creada a partir de la unión de las capas.

3.1.4. EVALUACIÓN DEL SISTEMA DE CROWDSOURCING

Localización de microorganismos

La localización de los microorganismos consiste en la creación de las máscaras. La máscara de una imagen es otra imagen con las mismas dimensiones, posee formas rellenas (se han utilizado círculos) centradas en la posición de los microorganismos y un fondo transparente. El tamaño de las formas es proporcional a los mismos y su color da información acerca del microorganismo.

Para la síntesis de máscaras se probaron varios programas (Slicer3D, GIMP, Power Point, Paint, Paint.net) y finalmente se escogió Paint.net por ser el más sencillo y evidente para esta tarea. La metodología es la siguiente:

1. Abrir la imagen cuya máscara se quiere crear
2. Crear una nueva capa
3. Disminuir la opacidad de la capa creada. Se han utilizado valores próximos a 80, sobre un máximo de 255. Esto permite visualizar toda la imagen a lo largo del proceso y centrar las formas sobre los microorganismos una vez creadas.
4. Insertar las formas sobre los microorganismos.
5. Eliminar la capa correspondiente a la imagen original.
6. Cambiar la opacidad al valor máximo.
7. Exportar la máscara. El formato de exportación es *.png* para preservar los colores originales y que no haya confusión a la hora de ejecutar el código de extracción de posiciones.

Paint.net presenta dos desventajas, la forma de editar máscaras y la imposibilidad de estandarizar o cuantificar el tamaño de las formas. A diferencia de otros programas, para eliminar, desplazar o modificar una forma es necesario borrarla y volverla a crear. Esto es laborioso y puede ser una fuente de errores si al eliminar una forma no se realiza correctamente. Si tras borrar una forma se queda por error parte de ella en la imagen, el código de extracción de posiciones determinará que en esa posición hay un microorganismo. Por otro lado, el tamaño de las formas se ajusta de forma visual sin poder reutilizar los tamaños de formas ya creadas.

Extracción posiciones microorganismo

Una vez obtenidas las máscaras es necesario extraer la posición en coordenadas cartesianas, el radio y el color de las formas. Este proceso se ha automatizado con un código en Matlab [35] cuya salida es un fichero de texto con formato .json. Este fichero, con un tamaño entre 1 y 3 KB, se almacena en el *backend* asociado a la imagen original a la que corresponde.

3.2.PROTOCOLO DE DIGITALIZACIÓN

3.2.1. PLANTEAMIENTO

Distintos estudios demuestran la validez del telediagnóstico a través de muestras digitalizadas (*whole slide images*, WSI) [2-4] en comparación con el diagnóstico convencional utilizando directamente el microscopio óptico. Hasta ahora, los estudios que validan este hecho se han realizado utilizando cámaras acopladas de forma fija al microscopio y adaptadas para este uso. Sin embargo, no existen estudios acerca de la validez y viabilidad del diagnóstico usando imágenes de microscopía adquiridas con un *smartphone*.

Las cámaras de los *smartphone* poseen lentes con curvaturas fijas que no están optimizadas para la digitalización a cortas distancias (< 2 cm.), como es el caso de la digitalización móvil-microscopio. Sin embargo, las cámaras de los *smartphones* ofrecen multitud de herramientas para optimizar la adquisición de la imagen. Además, el postprocesado con programas de tratamiento digital de imágenes permite ajustar la información de la imagen a ciertas necesidades. Con estas dos motivaciones, se realiza un estudio para determinar el dispositivo móvil y los parámetros de la cámara que permiten una óptima adquisición en el contexto en el que nos encontramos, así como, valorar el beneficio de técnicas básicas de procesado de imagen en la identificación de microorganismos.

Dado el interés se han realizado dos estudios de aplicabilidad del protocolo de adquisición propuesto, uno orientado a la identificación de *Mycobacterium Tuberculosis* en muestras de esputo y otro para la identificación y diferenciación de especies de *Plasmodium* en muestras de sangre.

3.2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio consiste en un cuestionario evaluado por un equipo médico especializado en microbiología. Entre las imágenes que se visualizan en cada pregunta, el especialista debe valorar cuál de ellas permite un mejor diagnóstico de la enfermedad en cuestión. Los resultados de cada pregunta se representarán en gráficos para evaluar la moda y la dispersión de los datos.

Para el estudio es necesario el microscopio con las muestras, el adaptador móvil-microscopio y los móviles a valorar. También es útil el uso de apps específicas de cámara ya que permiten modificar un mayor número de parámetros durante la digitalización. Para el diseño del estudio se ha utilizado Google Forms. Google Forms es una herramienta muy interesante en este contexto por su capacidad para visualizar imágenes, por sus diferentes formatos de respuesta (texto, tipo test respuesta única, tipo test respuesta múltiple, etc.) y por su alta usabilidad.

A continuación se mencionan las apps específicas para cámara y se justifica la elección en el sistema de una de ellas junto con los parámetros que permite modificar.

Apps Android de cámara

Camera de Google, Open Camera, HD Camera Ultra, Cámara FV-5 Pro, son algunas de las aplicaciones Android que permiten acceder a los parámetros de la cámara del teléfono móvil. Entre ellas destaca Cámara FV-5 Pro [36] por la amplia variedad de prestaciones que ofrece, aunque la capacidad de control de algunas de ellas no están disponibles en ciertos dispositivos.

A continuación se describen los parámetros de fotografía que se van a valorar en el estudio y los valores que pueden tomar en la aplicación Cámara FV-5 Pro. Los parámetros seleccionados son los que tienen un mayor uso en fotografía y están disponibles en la mayoría de aplicaciones de cámara. También se indica los valores que pueden tomar en la aplicación Cámara FV-5 Pro para cada uno de estos parámetros.

Resolución

Es el número de píxeles que contiene el mapa de bits de una imagen digital. Este valor viene determinado por el número de píxeles que utilice el sensor CCD de la cámara para captar la imagen. La resolución de una imagen indica el nivel de detalle que puede observarse en esta, pero no hace referencia a la calidad del detalle registrado. [37]

En Cámara FV-5 Pro este parámetro puede tomar los siguientes valores en megapíxeles: 0.1, 0.2, 0.3, 2.1, 3.1, 8, 8.3, 15.5, 18.7, 20.7. [36]

Zoom

El zoom es la capacidad de modificar el tamaño de la imagen sin variar la distancia entre la cámara y el motivo. Existe el zoom óptico y el zoom digital, pero en los dispositivos móviles sólo está disponible el digital. El zoom digital se puede implementar de dos maneras: aumentando el tamaño de los píxeles o aumentando el número de píxeles según se aumenta el zoom. Para el segundo caso existen diversos algoritmos que definen la forma de generar los nuevos píxeles.

En FV-5 Pro los valores de zoom varían entre 35 mm, valor estándar, y 144 mm en pasos de 1 milímetro. [36]

Enfoque

El enfoque es la capacidad de la óptica de hacer coincidir los rayos de luz que inciden en la cámara en el punto focal, que a su vez coincidirá con el sensor de la cámara. Enfocar es dejar nítido aquello que está a una distancia concreta.

El FV5 puede tomar los valores: Manual Focus, Macro, Face detection focus, Touch focus, Continuous autofocus, Infinity, Autofocus Lock. [36]

ISO

La ISO de una cámara determina el nivel de sensibilidad de la misma a la luz disponible. Cuanto mayor es el valor de la ISO más sensible será el sensor a los rayos de luz, sin embargo, menor será la nitidez de la imagen. Al doblar el valor de ISO se dobla también la sensibilidad del sensor de la cámara ante la luz. [38]

Los valores de ISO en la aplicación FV5 varían 50 y 3200 pudiendo elegir el valor automático. [36]

Compensación de la exposición

La compensación de exposición de una cámara, también llamada velocidad de obturación o tiempo de exposición, es la cantidad de tiempo en la que el obturador está abierto permitiendo el paso de la luz hacia el sensor. El tiempo de exposición debe reducirse si el objeto a fotografiar está en movimiento, si el tiempo de exposición es alto aparecerán zonas borrosas en torno a la imagen. [38]

Con FV5, los valores de exposición pueden modificarse en un rango de [-2, 2] con un paso de 0.2. Aumentar en una unidad el valor de exposición equivale a doblar el tiempo en el que el obturador se encuentra abierto. Por el contrario, disminuir en una unidad equivale a reducir a la mitad el tiempo de exposición. [36]

Balance de blancos

El balance de blancos es el ajuste por software que permite la correcta reproducción de los colores sin mostrar un color dominante. Los dominantes de color son especialmente notables en los tonos neutros (el blanco y los distintos tonos de gris), con independencia del tipo de luz que ilumina la escena.

Los colores capturados por las cámaras dependen de la iluminación. Una característica diferenciadora entre las fuentes de luz es la temperatura de color, que expresa la dominante de color para una fuente de luz determinada. La compensación de blancos consiste en ajustar la ganancia del sensor para cada una de las componentes de color.

La aplicación permite escoger diferente compensación de blancos en función de la temperatura de color. Las diferentes compensaciones de blancos ofrecidas son: Automatic, Cloudy, Sunny, Fluorescent light, Warm fluorescent light, Incandescent light [36].

4. RESULTADOS: VALIDACIÓN E INTEGRACIÓN DEL SISTEMA

4.1. TUBERCULOSIS

El sistema completo está implementado sobre muestras de esputo utilizadas para el diagnóstico de la tuberculosis. El sistema representa los procesos de adquisición y procesamiento de imágenes de TuberSpot. Los 4 pasos en los que se desarrolla el sistema son: elaboración del protocolo de digitalización en el que se realiza el estudio de optimización de imágenes, creación del repositorio de imágenes, implementación del control de calidad de los jugadores mediante la inserción de *phantoms* y elaboración del Gold Standard para la evaluación del crowdsourcing y el entrenamiento de jugadores.

4.1.1. PROTOCOLO DE DIGITALIZACIÓN

El protocolo de digitalización se ha implementado en base a un estudio en el que se determinan el dispositivo móvil y los parámetros de la cámara que permiten una óptima adquisición en el contexto en el que nos encontramos, así como, para valorar el beneficio de técnicas básicas de procesamiento de imagen en la identificación de *M. tuberculosis*.

Descripción

El objetivo del estudio es evaluar el dispositivo, así como las herramientas de digitalización y postprocesado de imágenes, para la detección de *Mycobacterium Tuberculosis* en muestras de esputo con tinción Ziehl-Neelsen.

Para el estudio se ha diseñado un cuestionario formado por 12 preguntas. En cada pregunta se incorporan varias imágenes, cada individuo debe elegir la imagen en la que se considera que sería más sencillo y preciso la detección de bacilos. En cada pregunta se evalúa un parámetro, dicho parámetro recibe diferentes valores en cada una de las imágenes de la pregunta permaneciendo el resto de parámetros con los valores predefinidos. Los valores predefinidos para los parámetros evaluados son los siguientes:

- Dispositivo de adquisición de imágenes: Sony Xperia Z2;
- Aplicación: Cámara FV-5 Pro;
- Resolución: 20.1 MPx;
- Zoom (número de aumentos): 0 mm (sin zoom);
- Enfoque: automático;
- ISO: automático;
- Compensación de exposición: 0;
- Apertura obturador: punto medio,
- Balance de blancos: automático;

- Contraste/brillo/saturación: +2;
- Postprocesado: ninguno;
- Luz sala: encendida;

Todas las imágenes del cuestionario son de la misma muestra y del mismo campo. Para visualizarlas, puede ser útil el zoom del navegador ('ctrl' y '+'). En cada pregunta sólo se puede elegir una única imagen, aunque haya imágenes en las que no se pueda detectar con claridad los bacilos. La imagen a elegir es aquella que podría ser más útil para apreciarlos. La respuesta "No sabe/No contesta" (NS/NC), está diseñada para las preguntas en las que no se observen diferencias entre las imágenes o que las diferencias que haya no modifiquen la capacidad para detectar bacilos. El cuestionario es individual y no posee límite de tiempo para su cumplimentación.

En el estudio se han utilizado muestras de pacientes reales, con un identificador específico para el estudio y ajeno al código de paciente. El microscopio utilizado es un Nikon Eclipse E200 y el adaptador móvil-microscopio es Digiscoping.

Contenido

A continuación se detalla el parámetro que se evalúa en cada pregunta y los valores que toma dicho parámetro en las imágenes a elegir.

Pregunta 1: dispositivo de adquisición de imágenes

- Imagen 1: Samsung SIII
- Imagen 2: Sony Xperia Z2
- Imagen 3: Cámara LUMIX (Panasonic, DMC-G3, objetivo: 0.3/1ft-infinito)

Pregunta 2: resolución

- Imagen 1: 20.1 MPx
- Imagen 2: 8 MPx

Pregunta 3: zoom (número de aumentos)

- Imagen 1: sin zoom
- Imagen 2: zoom 95
- Imagen 3: zoom 134

Pregunta 4: enfoque

- Imagen 1: automático
- Imagen 2: infinito
- Imagen 3: manual
- Imagen 4: macro

Pregunta 5: ISO

- Imagen 1: ISO 3200
- Imagen 2: ISO 800
- Imagen 3: alta sensibilidad (App Cámara)

Pregunta 6: compensación de exposición

- Imagen 1: 0.3
- Imagen 2: 0.7
- Imagen 3: 2
- Imagen 4: 1

Pregunta 7: zoom en función del dispositivo

- Imagen 1: zoom x4 con SIII
- Imagen 2: zoom 95 con Xperia
- Imagen 3: zoom Galería fotográfica de Windows

Pregunta 8: exposición mínima (forma de obtención)

- Imagen 1: compensación exposición 0.3 con la app Cámara FV-5 Pro
- Imagen 2: compensación exposición -1 con la app Cámara
- Imagen 3: apertura obturador corto con la app Cámara FV-5 Pro

Pregunta 9: balance de blancos

- Imagen 1: automático
- Imagen 2: bombilla

Pregunta 10: contraste/brillo/saturación

- Imagen 1: +2 (enfoco macro)
- Imagen 2: +4 (enfoco macro)

Pregunta 11: luz sala

- Imagen 1: luz apagada
- Imagen 2: luz encendida

Pregunta 12: suavizado + ajuste ventana

- Imagen 1: zoom 95 (enfoco macro,)
- Imagen 2: zoom 95 con filtro de media 3x3 y ajuste de brillo y contraste (enfoco macro)

Como ejemplo, en la Figura 16 se visualizan las imágenes utilizadas en la pregunta 6.

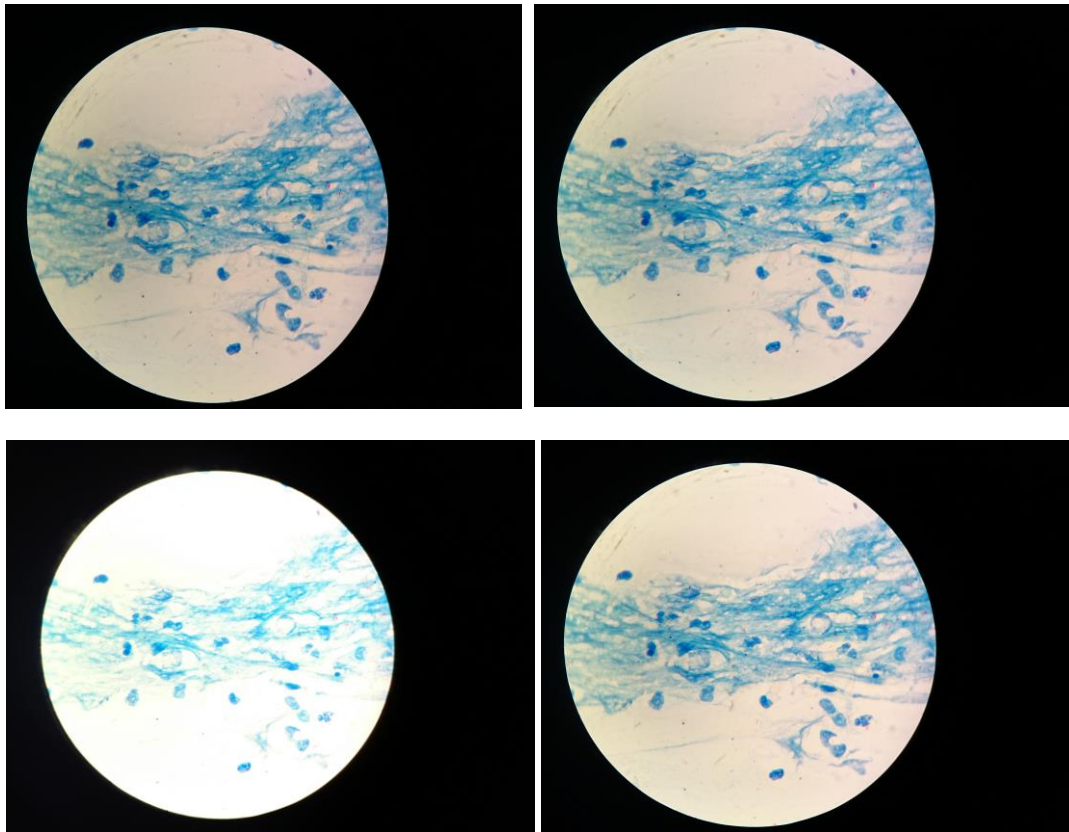


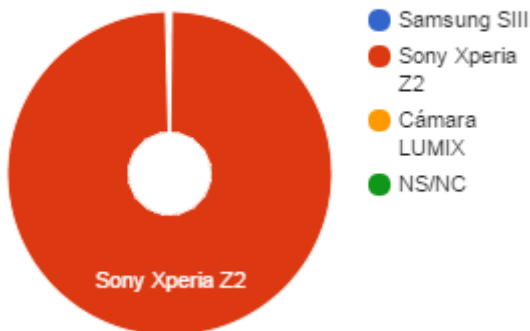
Figura 16. (De arriba hacia abajo y de izquierda a derecha) Imagen con valor de balance de blancos: 0.3, 0.7, 2, 1.

Resultados

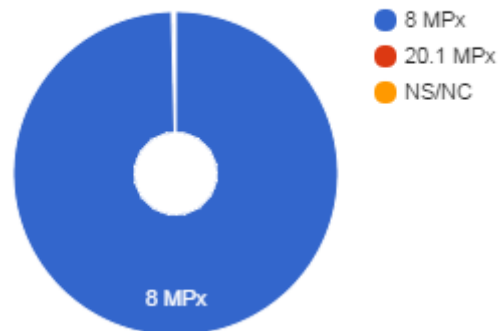
El cuestionario ha sido realizado por ocho personas del Servicio de Microbiología del Hospital Clínico San Carlos y del Programa Apopo [39] para la detección de tuberculosis. Entre los participantes hay tres médicos con larga experiencia en el diagnóstico de tuberculosis, cuatro residentes de Medicina y una residente de Farmacia. Las residentes poseen experiencia en el Servicio de Microbiología de entre uno y cuatro años.

Los resultados de cada pregunta del cuestionario se presentan a continuación:

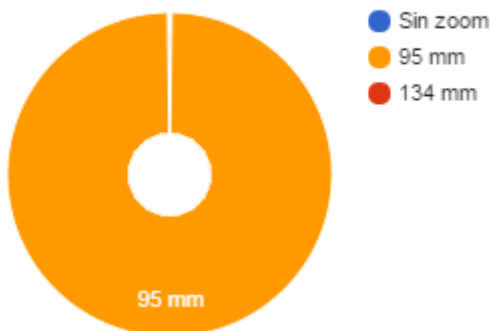
Dispositivo de adquisición



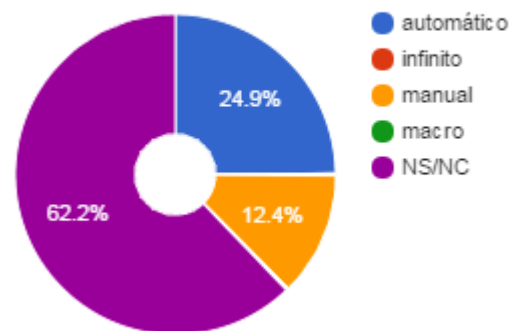
Resolución



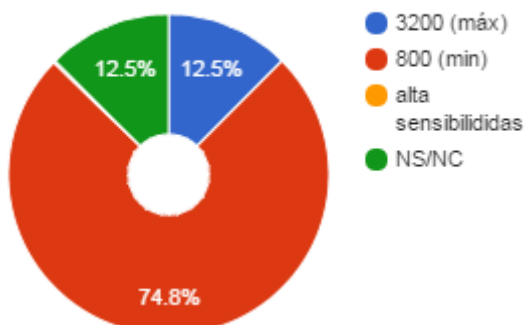
Zoom (aumentos)



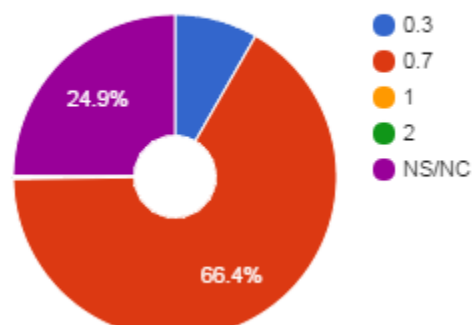
Tipo de enfoque



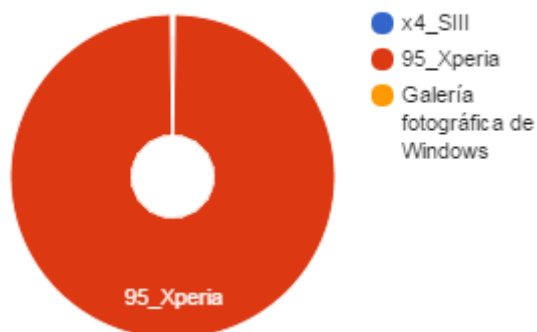
ISO



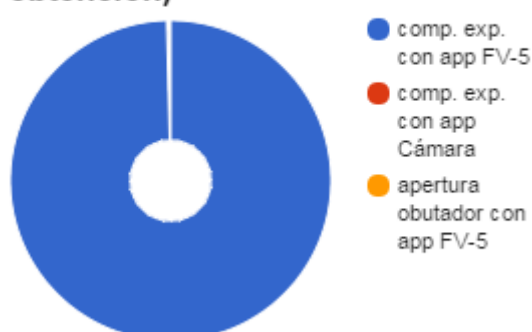
Compensación exposición



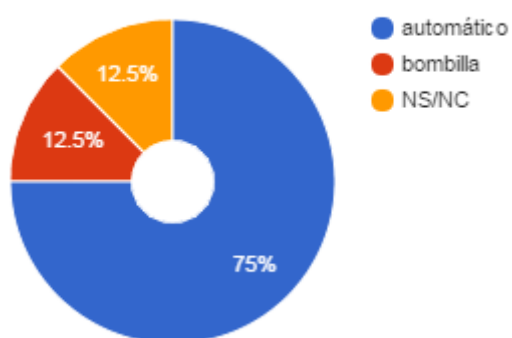
Zoom (dispositivo)



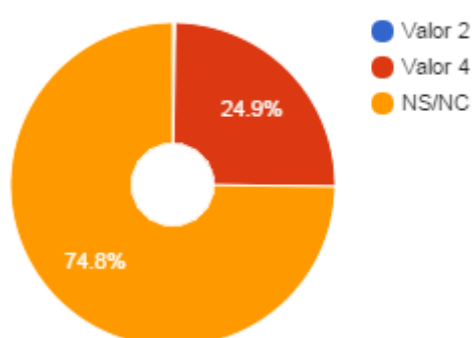
Exposición mínima (forma de obtención)



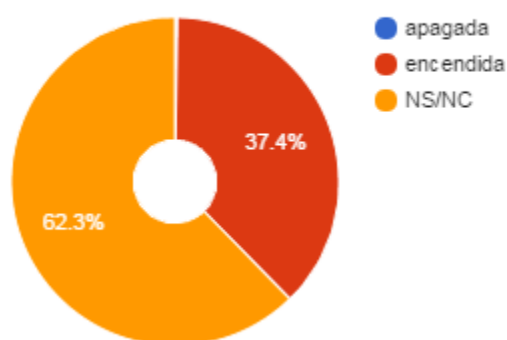
Balance de blancos



Constraste/Brillo/Saturación



Luz sala



Postprocesado

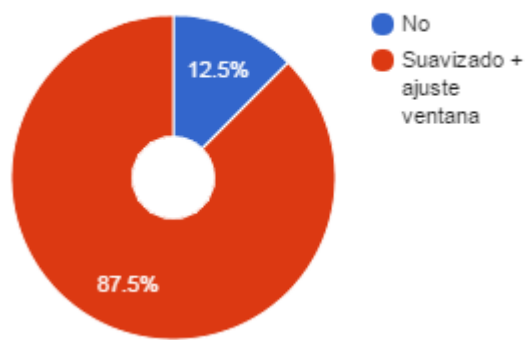


Figura 17. Resultados de la evaluación del protocolo de digitalización para tuberculosis.

Junto a estos resultados, a lo largo del estudio se recogieron observaciones que el equipo médico realizaba en cada pregunta. Las observaciones son parte de la información sobre la que se han extraído las conclusiones.

Las respuestas relativas al tipo de dispositivo, megapíxeles de resolución, aumentos del zoom, tipo de zoom y la forma de obtención de una exposición mínima fueron unánimes. El 100% de las respuestas corresponden a:

- Dispositivo: Sony Xperia Z2
- Resolución: 8 MPX

- Aumentos del zoom: 95 mm
- Tipo de zoom: aplicación Cámara FV-5 Pro
- Exposición mínima : (obtenida por) compensación de exposición

En cuanto al resto de respuestas, a pesar de que el volumen de datos es relativamente pequeño, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- No todos los dispositivos móviles y cámaras poseen las mismas capacidades de adquisición. Entre los analizados, Sony Xperia Z2 es el que adquiere imágenes con mayor fidelidad.
- A resoluciones de 8 MPx, el enfoque de la imagen es mejor que a 20.1 MPx.
- Las dimensiones de la imagen afectan al análisis: el zoom de 95 observado desde una pantalla de ordenador, permite un análisis cómodo. El zoom digital del dispositivo ofrece mejores resultados que el zoom obtenido al aumentar la imagen en programas estándares de visualización de imágenes.
- Aumentos en el contraste y brillo parecen recomendables para el análisis de imágenes. Estos parámetros se pueden modificar bien, ajustando la ventana de visualización con tratamiento digital, o bien, disminuyendo los tiempos de exposición. Los parámetros Contraste/Brillo/Saturación que permite modificar la aplicación FV-5 no modifican la imagen.
- Cada individuo prefiere analizar muestras cuya tinción es a la que está acostumbrado.
- El tipo de enfoque y la luz de la sala (el hecho de que esté encendida o apagada), parecen parámetros poco determinantes al poseer un alto porcentaje de respuestas “No sabe/No contesta”. En estos casos parece interesante estandarizar los valores automáticos. Los valores automáticos son más escalables si se tiene en cuenta que los parámetros modificables de la cámara dependen del modelo de teléfono móvil y de su versión de Android, a pesar de que se utilice la aplicación FV-5.
- En el balance de blancos, sumando las respuestas “automático” y “NS/NC” se obtiene un 87.5% de los votos, por lo que parece lógico definir el valor automático como el valor estándar de digitalización.
- En cuanto a la ISO, el 87.5% de los votos corresponden conjuntamente a “NS/NC” y a 800, el valor mínimo al cual tiende el dispositivo si digitaliza en modo automático, por lo que también parece interesante definir el valor automático como el valor estándar de digitalización.

El estudio junto con las observaciones también permite concluir que el centro del campo de visión queda mejor enfocado que los bordes de la imagen. A su vez, queda patente que debido a la profundidad de las muestras de esputo, no todos los niveles de profundidad pueden enfocarse simultáneamente sino que es preciso desplazar verticalmente la platina para enfocar a las diferentes profundidades.

Dos aspectos que no se valoraron en este estudio y son predominantes en el envío y almacenamiento de las imágenes, son la compresión de las imágenes y el valor mínimo aceptable de la resolución.

Se ha utilizado la resolución de 8MPx a costa de comprimir las imágenes. Ciertos dispositivos no están capacitados para representar imágenes de estas dimensiones, lo que

representa una limitación a la hora de universalizar el juego. El formato de adquisición de imágenes es *.png*, sin pérdidas.

4.1.2. REPOSITORIO DE IMÁGENES

Tras haber determinado los parámetros óptimos para la adquisición, se procedió a la digitalización de muestras reales de esputo en el Hospital Clínico San Carlos. El material para la adquisición es el microscopio, el adaptador móvil-microscopio y el móvil. Para esta prueba de concepto se ha utilizado el microscopio Nikon Eclipse E200, el adaptador Digiscoping y el móvil Sony Xperia Z2. La digitalización se realizó a 8MPx, con compensación de exposición a 0.7 y en formato *.png*. No se utilizó el zoom de la cámara, ya que las imágenes sin zoom también ofrecían resultados suficientemente buenos y la digitalización con zoom implica adquirir y analizar más imágenes.

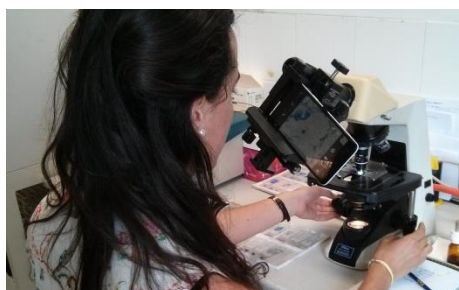


Figura 18. Digitalizando muestras de esputo.

En total se adquirieron 100 imágenes de 20 muestras diferentes, 4 muestras negativas, 4 muestras *scanty*, 4 muestras +1, 4 muestras +2 y 4 muestras +3. De cada muestra se obtuvieron 5 imágenes.

| Tipo de muestra | Nº de muestras digitalizadas | Nº de imágenes por muestra |
|--------------------|------------------------------|----------------------------|
| negativa | 4 | 5 |
| <i>scanty</i> | 4 | 5 |
| +1 | 4 | 5 |
| +2 | 4 | 5 |
| +3 | 4 | 5 |
| Total muestras: 20 | | Total imágenes: 100 |

Tabla 4. Clasificación de las imágenes digitalizadas.

De las 100 imágenes adquiridas se eligieron las 35 que poseían mejor enfoque para su incorporación en el juego TuberSpot. Las 35 imágenes se pueden clasificar en 3 grupos función del número de bacilos que contienen:

- Imágenes negativas: 10;

- Imágenes con 1-10 bacilos: 10;
- Imágenes con >10 bacilos: 15;

4.1.3. CONTROL DE CALIDAD DE JUGADORES

En total se segmentaron 5 modelos diferentes de *phantom* de las imágenes positivas digitalizadas. Los *phantoms* se insertaron únicamente en las imágenes correspondientes a campos negativos, aquellos que no contienen el microorganismo que se busca, bien porque la muestra no está contaminada por esta especie o bien porque, aunque la muestra sea positiva, el microorganismo no aparece en ese campo de la muestra.



Figura 19. Modelo de *phantom*.

4.1.4. REPOSITORIO DE REFERENCIA PARA LA EVALUACIÓN DE TUBERSPOT

La corrección de imágenes es el proceso por el cual se identifica y se marca la posición de los bacilos en cada una de las imágenes de esputo. La corrección de imágenes permite validar los clics de los jugadores y comprobar así la eficacia y viabilidad del juego.

Durante el proceso de corrección también se registró información complementaria. Por un lado, los bacilos *phantom* se identifican de forma diferente al resto de bacilos. Esta información es útil, ya que los clics sobre los bacilos simulados no se deben utilizar a la hora de contabilizar el número de bacilos en una muestra. Por otro lado, en las muestras de esputo existen regiones en las que los bacilos aparecen estrechamente unidos, los llamados “bancos de bacilos”. Para el jugador supone un problema hacer *click* sobre cada uno de los bacilos que forman estas regiones, ya sea porque están superpuestos y/o pegados y no se diferencian bien, o porque la precisión sobre la pantalla de un teléfono móvil es insuficiente para hacer diferentes clics en regiones tan pequeñas. Una posible solución sería que el jugador aumentara el zoom, sin embargo, este parámetro está limitado por el juego. Existe un compromiso entre el zoom y la conservación de la morfología que permite identificar al bacilo, por lo cual, para conseguir un diagnóstico consistente, no se debe ampliar la imagen indefinidamente. Por estos motivos, durante la corrección de imágenes también se debían clasificar los bancos de bacilos en función del número de bacilos que contenían.

Dentro de un banco, los bacilos pueden estar superpuestos y/o pegados. Esto dificulta el conteo exacto del número de bacilos en dicho banco. Por este motivo unido a que el número exacto de *Mycobacterium tuberculosis* no es determinante a la hora de generar un diagnóstico, la clasificación permite diferenciar los bancos de la siguiente manera:

- Grupo 1: 1 bacilo (RGB de la máscara: 255-0-0)
- Grupo 2: 2-4 bacilos (RGB de la máscara: 0-255-0)
- Grupo 3: 5-10 bacilos (RGB de la máscara: 0-255-255)
- Grupo 4: >10 bacilos (RGB de la máscara: 0-0-255)

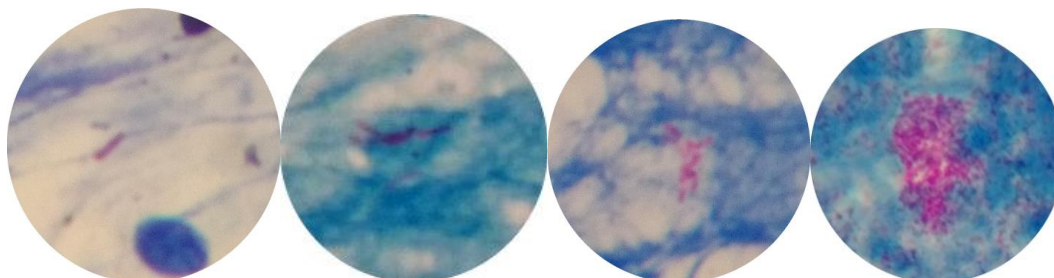


Figura 20. (De izquierda a derecha) Modelo de los grupos 1, 2, 3 y 4

El juego está implementado en cuatro fases: en las fases 1 y 2 el objetivo es localizar los bacilos o bancos de bacilos; en las fases 3 y 4, además de identificar los bacilos y bancos de bacilos, es necesario indicar a qué grupo de los 4 mencionados corresponde la región sobre la que se ha realizado el clic.

La corrección de las imágenes no es evidente. Depende de la persona, la experiencia y la pericia y el momento del día. Por esto motivos, es recomendable que una misma imagen sea corregida por más de un experto.

La clasificación de una estructura de la imagen como incierta es muy controvertida, ya que no hay unos límites definidos entre un bacilo y un “incierto”. La existencia de estructuras que son aparentemente bacilos pero que el desenfoque o la tinción no permiten confirmarlo, puede generar dudas al jugador cuando hace clics sobre un incierto y le aparece una señal de error. Para evitar la confusión del jugador, en estas situaciones se imprime el mensaje “No tenemos seguridad de que esto pueda ser un bacilo”. Estas estructuras se han representado en la máscara con un color distinto (RGB de la máscara: 0-0-0).

Los bacilos *phantom* insertados en la imagen deben quedar registrados como tal en la máscara (RGB de la máscara: 255-255-0) para contribuir a la verificación de clics pero sin formar parte del recuento de bacilos en el campo.

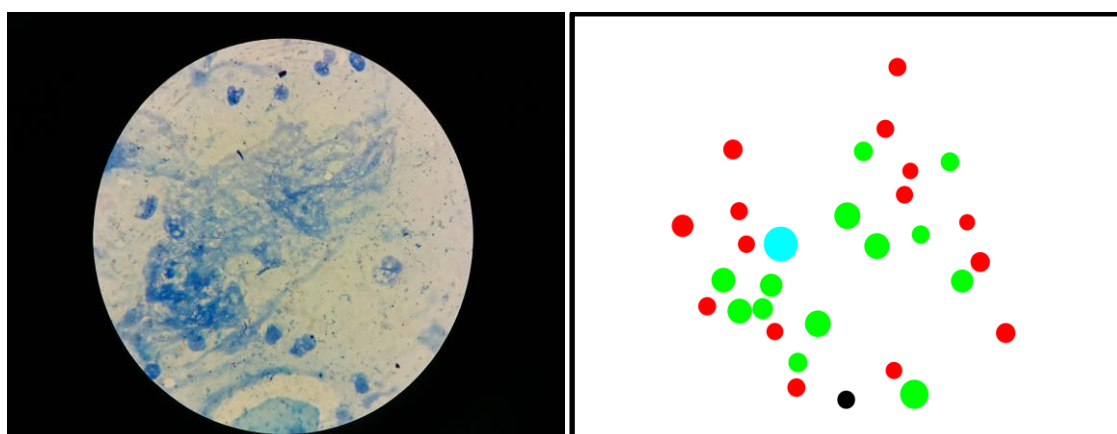


Figura 21. Imagen de un campo de una muestra de esputo junto con su máscara.

4.1.5. INTEGRACIÓN Y PRUEBAS DEL SISTEMA PROPUESTO

El 24/03/2015, día mundial de la tuberculosis se lanzó el juego TuberSpot con las 35 imágenes adquiridas y analizadas por expertos. Actualmente, se han jugado más de 13.000 partidas que corresponden aproximadamente a 1.000 jugadores. Los jugadores son personas de cualquier lugar del mundo sin restricción de edad, sexo o estudios, que no precisan poseer conocimientos médicos o técnicos para jugar a TuberSpot. Es en la primera fase del juego donde los jugadores realizan un tutorial con la información necesaria para aprender a diferenciar *M. tuberculosis* de otras posibles que estructuras que puedan aparecer en la muestra.

El objetivo del juego es hacer clic, ya sea con un ratón o posando el dedo sobre la pantalla del dispositivo, sobre cualquier bacilo o grupo de bacilos e indicar el número de bacilos que se observen en esa posición. A lo largo del juego se intercalan partidas de entrenamiento y partidas ‘reales’. En las partidas de entrenamiento se le muestra al jugador el número de parásitos que le falta por encontrar en la imagen y se le da *feedback* positivo si realiza un clic sobre un bacilo y *feedback* negativo en caso contrario. Las partidas ‘reales’ simulan la situación en la que el número y la posición de bacilos son desconocidas por el sistema, por lo que al jugador no se le muestra ninguna información sobre la muestra o su actuación.

Con un algoritmo de inteligencia artificial se integran los resultados de todos los jugadores que han analizado una misma imagen. La salida del algoritmo es el número total de posiciones en las que el *crowd* valida que hay un bacilo, y la imagen original con recuadros sobre la posiciones que se han validado (ver Figura 22). Es importante tener en cuenta que no todos los clics realizados por los jugadores se validan como posiciones en las que hay bacilos.

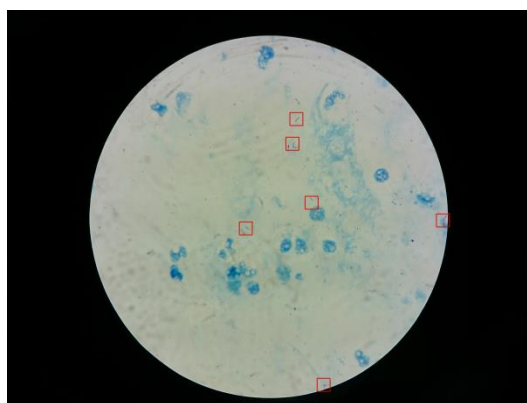


Figura 22. Imagen analizada en TuberSpot con recuadros rojos sobre las posiciones que han sido validadas por el algoritmo de inteligencia artificial.

Para evaluar la eficiencia de la inteligencia colectiva y la gamificación en la identificación de *M. tuberculosis* se han comparado las posiciones validadas por el algoritmo de inteligencia artificial con respecto a las posiciones registradas en el *Gold Standard*. Se ha demostrado que la sensibilidad de TuberSpot para la identificación de *M. tuberculosis* es del 90% asociada a un 88% de precisión [40]. Entendiendo la sensibilidad como el porcentaje de

bacilos del *Gold Standard* que se han validado por el sistema de inteligencia colectiva y la precisión como el porcentaje de posiciones validadas que se corresponden con bacilos del *Gold Standard*.

Adicionalmente, en junio de 2015 se ha validado el sistema de adquisición en una prueba sobre el terreno en un centro de salud de Mozambique. En esta prueba sobre el terreno se adquirieron 53 imágenes con el adaptador Digiscoping y con el teléfono móvil Sony Xperia Z2. Desde que se pulsó el botón de envío de imágenes en la aplicación ‘Microscope’ hasta que las imágenes estuvieron disponibles y accesibles en el sistema de *backend* transcurrieron aproximadamente cinco minutos.

4.2.MALARIA

Dada la posible utilidad del sistema de adquisición en enfermedades de gran incidencia global y para probar la escalabilidad de dicho sistema, se ha expandido su desarrollo a muestras de sangre susceptibles de estar infectadas por parásitos del género *Plasmodium*, causantes de la malaria. Esta prueba de concepto permite validar los resultados obtenidos en el estudio para la elaboración del protocolo de digitalización para muestras de esputo así como profundizar en nuevos conceptos.

Esta prueba de concepto forma parte de un estudio, realizado en colaboración con la Universidad Complutense de Madrid, para valorar la viabilidad de la gamificación y el crowdsourcing en la diferenciación de las especies del parásito que produce la malaria. En esta prueba de concepto se ha realizado una nueva evaluación del protocolo de digitalización y se ha creado un repositorio de imágenes de sangre. Aunque en este trabajo no se contemplan, los siguientes pasos necesarios para introducir las imágenes en el juego MalariaSpot serían: creación del *Gold Standard*, transformación de los criterios diagnósticos a microtarefas que puedan realizar jugadores inexpertos, validar los pasos anteriores con voluntarios inexpertos, adaptación a formato videojuego y creación de un algoritmo para la integración de resultados.

A continuación se expone la elaboración del protocolo de digitalización, y los datos generales de la digitalización.

4.2.1. CONTEXTO

La malaria o paludismo es una enfermedad parasitaria producida por la infección de varias especies del género *Plasmodium*. En humanos, las 5 especies que causan enfermedad son *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*, aunque otras infecciones son posibles. En general, y también en nuestro país, la principal especie causante de malaria importada es *P. falciparum*.

La malaria es una enfermedad potencialmente mortal y su diagnóstico siempre se considera urgente. La sangre debe extraerse en cuanto se sospeche malaria, haya o no fiebre en ese momento. Puede ser necesario extraer hasta 3 muestras para descartar la infección, sobre todo en pacientes que han recibido fármacos antipalúdicos. Es altamente recomendable disponer del resultado de forma urgente (menos de 3 horas tras la extracción). El retraso en el diagnóstico no debe demorar el inicio de tratamiento antimalárico empírico si la probabilidad de malaria es alta y el paciente está grave. [41]

La gota gruesa seguida de la extensión sanguínea sigue siendo el «patrón áureo» para el diagnóstico de la malaria importada. Tanto la gota gruesa como la extensión sanguínea se analizan con microscopios ópticos para valorar y cuantificar la presencia de parásitos de malaria. No se recomienda sustituir la microscopia por el test de diagnóstico rápido (TDR), ya que este presenta un elevado número de falsos negativos en casos de malaria no-falciparum. Se informará como mínimo si el paciente tiene o no malaria, y en caso afirmativo, si es o no por *P.*

falciparum. Cuando esté disponible el resultado de la microscopia, se añadirá al informe la identificación de especie y el grado de parasitemia expresada como porcentaje de hematíes. [41]

La identificación de la especie infectante es difícil de identificar en la gota gruesa, por lo que se debe realizar la extensión sanguínea. La extensión permite identificar con más facilidad la especie infectante y las parasitaciones mixtas. Se recomienda cuantificar la parasitemia (habitualmente expresada como número de parásitos por microlitro de sangre o como porcentaje de hematíes parasitados), ya que es un factor pronóstico importante. El estudio de la parasitemia tras recibir el tratamiento permite monitorizar la respuesta al tratamiento y la aparición de resistencias. [41]

4.2.2. PROTOCOLO DE DIGITALIZACIÓN

Descripción

A diferencia del estudio realizado para tuberculosis, en este caso se han analizado únicamente los parámetros de la cámara que permiten una adquisición óptima para la identificación de las diferentes especies de los parásitos que producen la malaria. Se ha realizado un estudio más exhaustivo en cuanto a la resolución y la ISO y se han analizado independientemente los parámetros contraste, saturación y nitidez. Además se han valorado nuevos parámetros, el formato de archivo de las imágenes (.jpeg, .png), el modo de medición de luz (punto, matriz, centrado compensado), el brillo y programas predeterminados de exposición (automático y regulación de la exposición). Sin embargo, se observó que la variación en los modo de medición de luz, la ISO, el contraste, la saturación, la nitidez o los programas de exposición no repercuten en la imagen adquirida por lo no se incorporaron en el test.

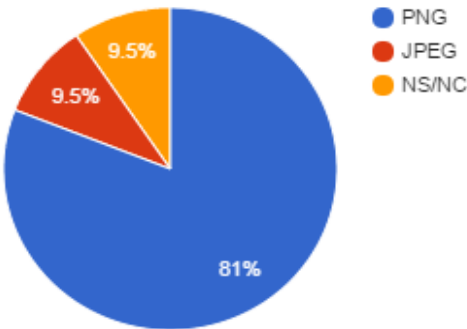
El material utilizado para el estudio consistió en un microscopio Zeiss modelo AX05COP2, el adaptador Digisoping y el teléfono móvil Sony Xperia Z2. Las muestras de sangre corresponden a pacientes reales distribuidos por el territorio español conservadas en el Laboratorio de Microbiología y Parasitología del Hospital Carlos III. Sus datos han sido debidamente anonimizados para el estudio.

La única diferencia en los parámetros predefinidos de digitalización respecto al estudio en tuberculosis es la resolución utilizada de 3.1 MPx.

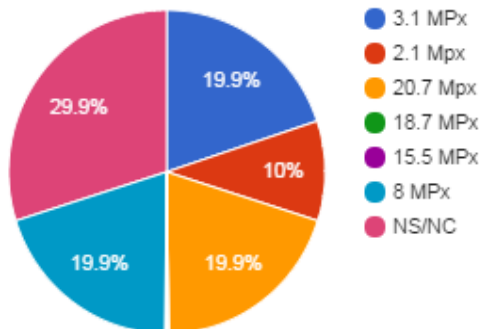
El diseño del test es equivalente al realizado para tuberculosis con tres pequeñas variaciones: las personas que realizan el test dejen observaciones por escrito, se permite la respuesta múltiple y existen preguntas de verificación en las que se comparan diferentes valores de dos parámetros ya analizados. Con las preguntas de verificación se busca conocer la variabilidad intraobservador en las respuestas.

Resultados

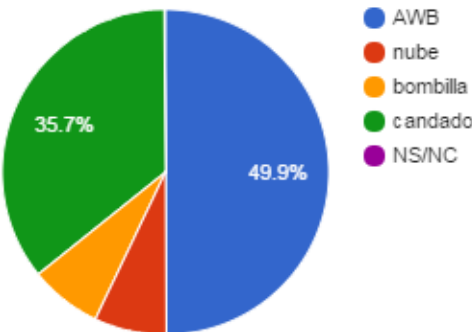
Formato imagen



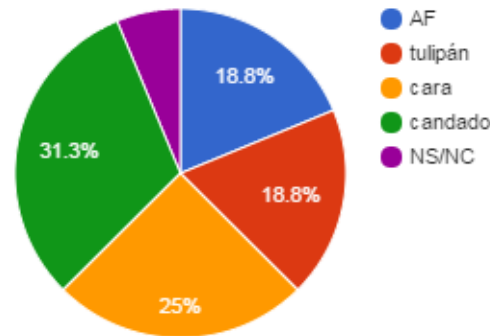
Resolución



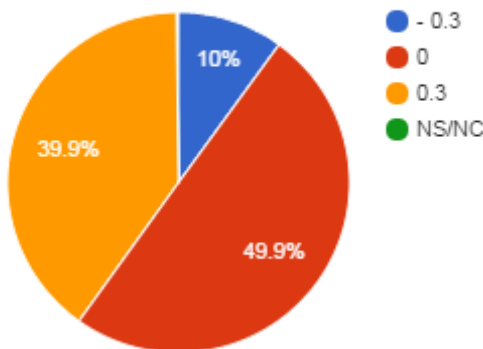
Balance de blancos



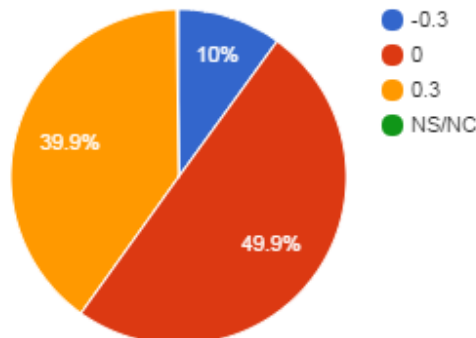
Enfoque



Brillo



Compensación de exposición



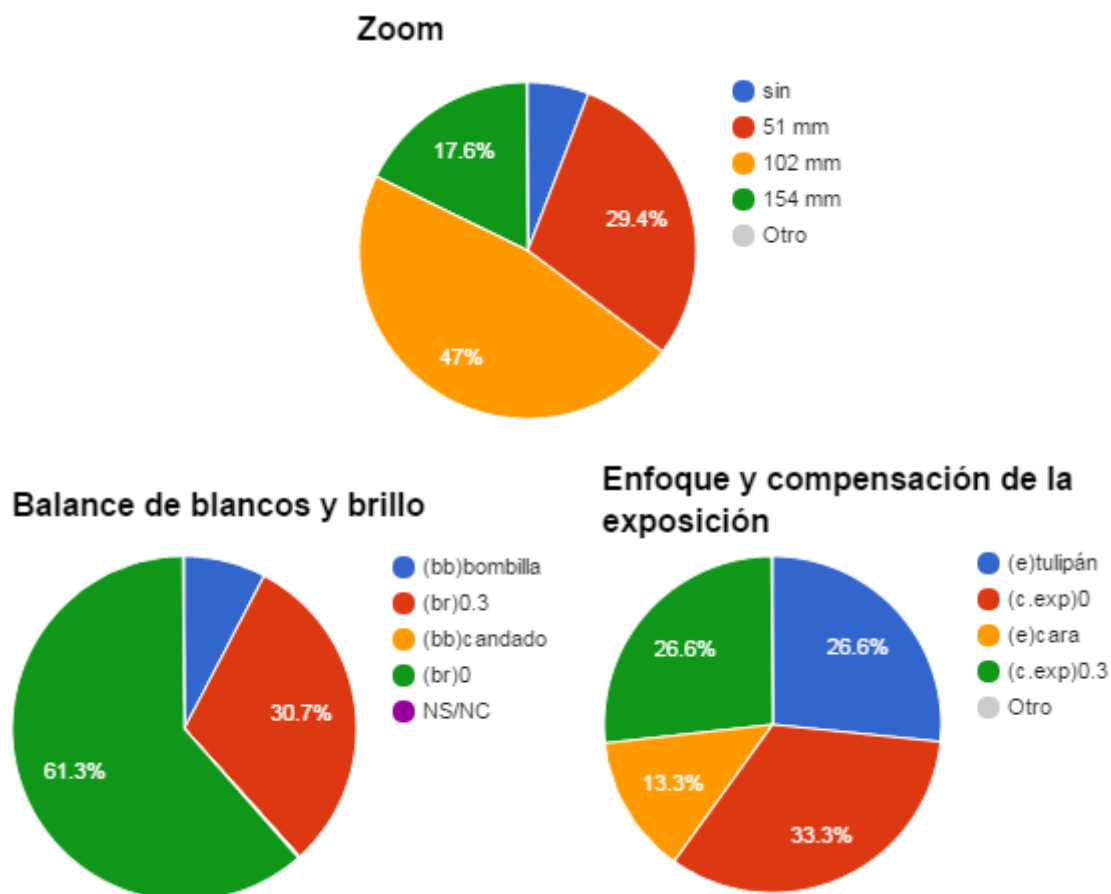


Figura 23. Resultados de la ‘evaluación del protocolo de digitalización’ para malaria.

El cuestionario ha sido realizado por 10 personas del Laboratorio de Microbiología y Parasitología del Hospital Carlos III y del grupo de innovación en biotecnología aplicada a salud de la facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

A continuación se comentan los resultados obtenidos sobre cada parámetro. Los porcentaje que se utilizan siguen la nomenclatura “(porcentaje de respuestas que apoyan el valor definitivo + porcentaje de respuestas NS/NC)”.

- Resolución: ninguna respuesta supera el 20%. Parámetro no determinante o no validable con estos datos. Se utilizará 3.1MPx porque mayor número de dispositivos soportan la visualización de estas resoluciones con respecto a resoluciones superiores. El menor peso de las imágenes facilita su almacenamiento y envío.
- Formato imagen: PNG (81% + 9.5%)
- Balance de blancos: automático (50%) + confirmación en pregunta de verificación
- Enfoque: ninguna respuesta supera el 30.1% y controversia con pregunta de verificación. Parámetro no determinante o no validable con estos datos. Se utilizará el valor automático
- Brillo: automático (50%) + confirmación en pregunta de verificación
- Compensación de exposición: automático (50%) + confirmación en pregunta de verificación

- Zoom: 102 mm (47.1%), todo zoom es preferible a la imagen sin aumentos (94.1%)

En base a los resultados y observaciones obtenidas a lo largo del estudio, los valores considerados como óptimos son los siguientes:

- Resolución: 3.1 MPx
- Formato de imagen: PNG
- Balance de blancos: AWB
- Brillo: cero
- Enfoque: automático
- Compensación de exposición: cero
- Contraste: 2
- Saturación: 2
- Nitidez: 2
- Modo de medición de luz: centrado compensado
- ISO: automático
- Zoom: 102 mm
- Obturador microscopio: 2.5 y 3.(valores intermedios)
- Intensidad luz microscopio: 4 y 5 (valores intermedios)

4.2.3. REPOSITORIO DE IMÁGENES

La digitalización se realizó con los parámetros considerados óptimos. En cuanto al zoom, se desconoce si es preferible adquirir y analizar mayor número de imágenes con zoom o reducir el número de imágenes a costa de tener menos aumentos para la diferenciación de especies. Ante la duda, se ha digitalizado con zoom (51mm) y sin zoom. Ambos grupos de imágenes se distribuirán entre los jugadores para valorar los beneficios del uso del zoom.

En total 20 muestras han sido digitalizadas, 4 de cada especie (*P. falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* y *P. knowlesi*), obteniendo 5 imágenes por muestra. En total se digitalizaron 100 imágenes. Junto con cada imagen se registró la siguiente información: código identificador de la muestra, parasitemia de la muestra (número de parásitos/muestra) y comentarios sobre la muestra (estado de la muestra, señales de tratamiento, número de campos observados, etc.).

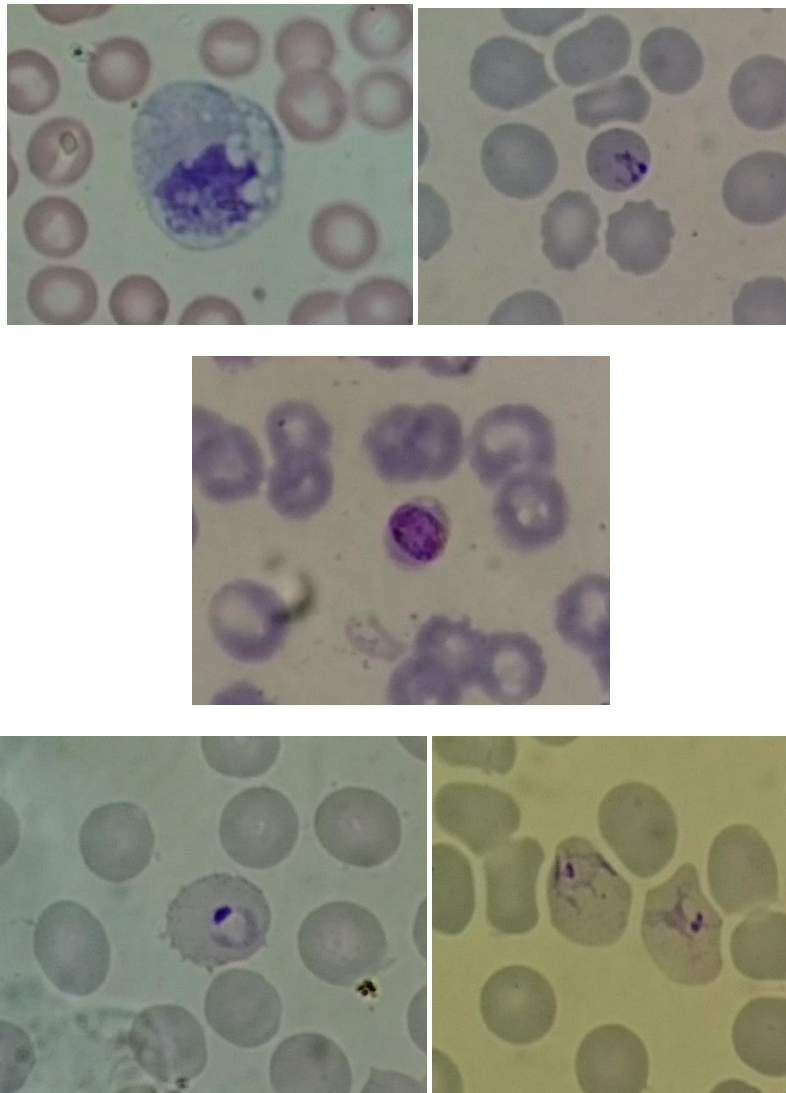


Figura 24. (De izquierda a derecha y de arriba hacia abajo) Imágenes de las especies *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. vivax*.

5. TRABAJOS FUTUROS

5.1.MICROSCOPIA MÓVIL

A pesar de los rápidos avances de la microscopía óptica, sus diferentes modalidades requieren configuraciones complejas y de coste elevado que las hacen inaccesibles en regiones de pocos recursos. Por este motivo, en la última década se ha abierto un nuevo campo de investigación en el que se desarrollan tecnologías baratas, compactas, ligeras y sencillas de usar que adquieren imágenes lo suficientemente precisas para generar resultados útiles en el campo de la salud. Además. Estos “microscopios portátiles” se integran a través de teléfonos móviles en redes de comunicación inalámbrica. A continuación se muestran los resultados de algunas de las investigaciones más recientes.

Foldscope [42]

En la Universidad de Standford, el grupo de investigación de Prakash Lab ha diseñado Foldscope, un microscopio por menos de un dólar a partir de una cartulina doblada y una lente.



Figura 25. Individuo usando un Foldscope. (Fuente: Catdumb)

Este innovador dispositivo pesa 8.8 gramos y cabe en el bolsillo ($70 \times 20 \times 2$ mm³). Su diseño se caracteriza por el minimalismo, la robustez y la escalabilidad. La resolución de las imágenes obtenidas por Foldscope es de 800 nanómetros y la magnificación que alcanza es de 2000 aumentos, valor considerablemente superior a otros dispositivos similares. Foldscope está acoplado a una fuente externa de luz y no precisa suministro eléctrico. Tanto el *field of view* como la distancia focal se pueden modificar de forma sencilla por el usuario.

El acoplamiento con el teléfono móvil se realiza a través de dos bandas magnéticas, una de ellas acoplada al teléfono móvil y otra al microscopio. Al juntar ambos elementos, la cámara del teléfono y la lente y muestra del Foldscope quedan alineadas.

Sistema *smartphone*-PDMS [43]

Yu-Lung Sung ha dirigido una investigación desde la Universidad de Houston para el desarrollo de lentes de magnificación de bajo coste. Las lentes se han fabricado con un polímero de textura viscosa, el polidimetilsiloxano (PDMS). Al dejarlo caer de forma precisa sobre una placa caliente el PDMS se endurece dando lugar a una lente flexible algo más gruesa y pequeña que una lente de contacto. La curvatura, y por tanto la magnificación de la lente, quedan determinadas en función de la temperatura de la placa y del tiempo que permanece la lente sobre ella. El coste de fabricación de cada una de estas lentes es aproximadamente 3 céntimos de dólar.



Figura 26. Individuo sujetando 4 lentes PDMS. (Fuente: The higher learning)

Las lentes PDMS permiten visualizar imágenes de 120 aumentos con una resolución de un micrómetro, equivalente a utilizar un microscopio Olympus IX-70 con una magnificación de 100X. La distancia focal está determinada por la morfología de cada lente pudiendo alcanzarse valores de 5.6 milímetros. Lente y teléfono se pueden unir directamente sin necesidad de estructuras complementarias. Esta unión no es rígida, la lente se puede extraer sin dificultad.

Keeploop [44]

Keeploop es un dispositivo de 80x36x9 milímetros de dimensión y 23 gramos de peso que se ajusta fácilmente a tecnologías móviles. Su magnificación es de 12X y su resolución de 6-10 micrómetros. Aunque estos parámetros son considerablemente inferiores a los de los dispositivos anteriores y su precio es de 109€, keeploop se encuentra en el mercado y posee múltiples aplicaciones en la industria de impresión, en seguridad, en instituciones educativas e incluso en el campo médico.



Figura 27. iPad alineado con un dispositivo Keeploop. (Fuente: Wikipedia)

Estas tecnologías en conjunto son robustas, sencillas de usar y de un coste de adquisición llamativamente reducido. A continuación se comparan los precios de dos microscopios utilizados en la rutina clínica, Motic B3-220PL y Olympus BX50, con respecto a las tecnologías móviles antes comentadas. Los datos están representados en escala logarítmica para una mejor comprensión de la información.

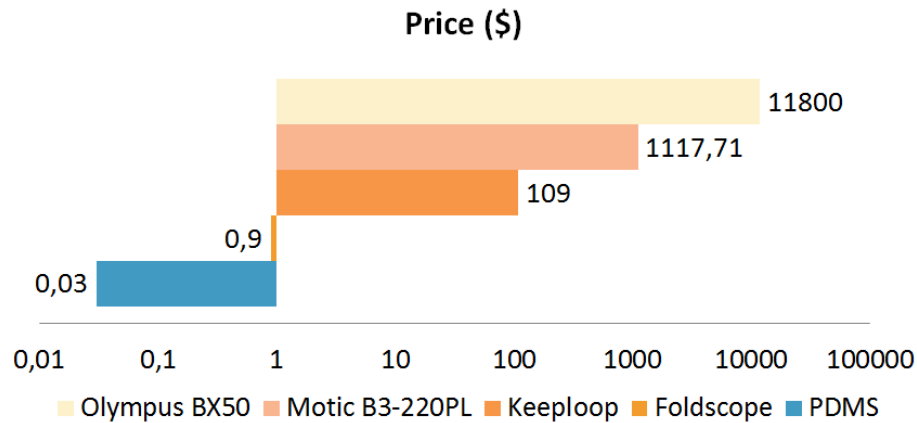


Figura 28. Comparación de precios de diferentes tecnologías para la adquisición de imágenes de microscopía.

Con estos resultados se puede afirmar que por el precio de un Olympus BX50 se pueden adquirir casi 4 millones de lentes PDMS.

Existen otros dispositivos también específicos para la adquisición de imágenes de microscopio [45-49]. Destacan algunos de ellos por: generar campos de fluorescencia [45], poseer diseñado sin lentes [46], incluir algoritmos de procesamiento de imágenes [45, 47] o haber sido testados en contextos clínicos en más de 20 países [49].

Estos dispositivos suponen una revolución para la telemedicina, permiten el diagnóstico de enfermedades en zonas remotas o de escasos recursos. Sin embargo, el mercado de la microscopía móvil se enfrenta a grandes retos. Los aumentos disponibles con estas tecnologías suelen ser escasos para el diagnóstico de enfermedades. En el caso del cáncer de útero se precisan 400 aumentos y para la malaria o tuberculosis son necesarios 1000 aumentos para un correcto diagnóstico. Las aberraciones, la dificultad para enfocar todo el campo de visión (ver Figura 29), y la falta de medios para barrer la muestra son otros de los motivos que dificultan su introducción como instrumentos de diagnóstico



Figura 29. Muestra de sangre con parásitos de malaria. (Fuente: Microcosmos de Foldscope)

6. CONCLUSIONES

Las tecnologías móviles han vivido un importante crecimiento en su potencialidad y funcionalidades que ha permitido su incorporación en el campo de la telemedicina. En este Trabajo de Fin de Grado se ha diseñado e implementado un sistema y protocolo de adquisición de imágenes de microscopía basado en telefonía móvil y adaptadores móvil-microscopio, y se ha optimizado para la digitalización de muestras de esputo susceptibles de tuberculosis y muestras de sangre susceptibles de malaria. En este trabajo se han impreso en 3D adaptadores móvil-microscopio con un coste inferior a un euro.

El sistema de digitalización propuesto no requiere conocimientos técnicos y su coste es mínimo en comparación con los métodos actuales de digitalización que precisan un PC más una cámara, oculares y software específicos. En este sistema se ha validado la calidad de las imágenes para la identificación y conteo de *M. tuberculosis* en para diferentes microscopios y adaptadores, tanto en hospitales españoles como en una prueba sobre el terreno en Mozambique.

Con el sistema de adquisición propuesto se han creado los dos primeros repositorios de imágenes adquiridas con telefonía móvil, uno con muestras reales de sangre y otro con muestras reales de esputo. El repositorio de muestras de esputo contiene 100 imágenes correspondientes a 20 muestras que en conjunto representan todas las posibles gradaciones de bacilos (negativo, scanty, +1, +2, +3). Las 35 imágenes mejor enfocadas se han analizado y clasificado en colaboración con personal médico cualificado, extrayendo la posición y número de los bacilos. Y en 10 de estas imágenes se han insertado bacilos simulados como base para un control de calidad del análisis. Las 35 imágenes seleccionadas se han introducido en TuberSpot, donde han sido analizadas por 1.000 jugadores aproximadamente en más de 13.000 partidas. Al comparar las posiciones de los bacilos identificadas por el personal médico y las posiciones validadas por el sistema de inteligencia colectiva, se prueba que la sensibilidad de TuberSpot para la identificación y conteo de *M. tuberculosis* es del 90% asociada a un 88% de precisión.

Para aumentar la calidad del enfoque en las imágenes se propone como posible mejora un desplazamiento vertical y automatizado de la platina. Digitalizar a varios niveles de Z permitiría enfocar los bacilos situados a diferentes profundidades de campo. Actualmente existen estudios que validan la mejora en la sensibilidad y especificidad del diagnóstico bacteriano con imágenes tridimensionales de microscopía [50]. Otro trabajo a plantear es pasar de la digitalización de campos individuales de la muestra a la digitalización automática de toda la muestra, crear el ‘whole slide image’ (WSI). Hoy en día, existen tecnologías que implementan el WSI, sin embargo, su coste aún es elevado [51]. En cuanto al procesado de imágenes, en este trabajo se ha diseñado e implementado un protocolo de inserción manual de los bacilos simulados. Dentro de los objetivos a corto plazo se encuentra la inserción automática de bacilos en todas las imágenes, adaptando los canales HSV del bacilo simulado a los de la imagen.

7. BIBLIOGRAFÍA

- [1] WHO. (2014). Global Tuberculosis Report 2014. World Health Organization.
- [2] Campbell, W. S., Lele, S. M., West, W. W., Lazenby, A. J., Smith, L. M., & Hinrichs, S. H. (2012). Concordance between whole-slide imaging and light microscopy for routine surgical pathology. *Human pathology*, 43(10), 1739-1744.
- [3] Al-Janabi, S., Huisman, A., Vink, A., Leguit, R. J., Offerhaus, G. J. A., ten Kate, F. J., & van Diest, P. J. (2012). Whole slide images for primary diagnostics of gastrointestinal tract pathology: a feasibility study. *Human pathology*, 43(5), 702-707.
- [4] Ho J, Parwani AV, Jukic DM, Yagi Y, Anthony L, Gilbertson JR. Use of whole slide imaging in surgical pathology quality assurance: design and pilot validation studies. *HUM PATHOL* 2006;37:322-31.
- [5] Sheeba, F., Thamburaj, R., Michael, J. S., Maqlin, P., & Mammen, J. J. (2012). Segmentation of sputum smear images for detection of tuberculosis bacilli. *BMC Infectious Diseases*, 12(Suppl 1), O14.
- [6] Tuberspot.org, (2015). TuberSpot. Last access: 8 July 2015, from <http://tuberspot.org/es/>
- [7] Cooper, S., Khatib, F., Treuille, A., Barbero, J., Lee, J., Beenen, M., ... & Popović, Z. (2010). Predicting protein structures with a multiplayer online game. *Nature*, 466(7307), 756-760.
- [8] Kim, J. S., Greene, M. J., Zlateski, A., Lee, K., Richardson, M., Turaga, S. C., ... & Seung, H. S. (2014). Space-time wiring specificity supports direction selectivity in the retina. *Nature*, 509(7500), 331-336.
- [9] Malariaspot.org, (2015). MalariaSpot: Una plataforma de crowdsourcing para diagnosticar la malaria a través de juegos online. Last access: 8 July 2015, from <http://malariaspot.org/>
- [10] Luengo-Oroz, M. A., Arranz, A., & Frean, J. (2012). Crowdsourcing malaria parasite quantification: an online game for analyzing images of infected thick blood smears. *Journal of medical Internet research*, 14(6).
- [11] ITU, (2015). Statistics. Last access: 8 July 2015, from <http://www.itu.int/ict/statistics>
- [12] Who. (2014). World malaria report 2013. World Health Organization.
- [13] Uplekar, M., Figueroa-Munoz, J., Floyd, K., Getahun, H., & Jaramillo, E. (2006). The Stop TB Strategy: building on and enhancing DOTS to meet the TB-related Millennium Development Goals.
- [14] Gaviria, M. B., Henao, H. M., Martínez, T., & Bernal, E. (2010). The role of health care providers in the late diagnosis of pulmonary tuberculosis among adults in Medellín, Colombia. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 27(2), 83-92.
- [15] Muñoz, D., Ríos, G., Villalva, C., & Muñoz, S. (2004). Factores asociados al diagnóstico tardío de pacientes con tuberculosis pulmonar en Lima Este, Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 20(1), 18-22.
- [16] Weyer, K. (1998). Laboratory services in tuberculosis control. Part II: microscopy. *World Health Organization Technical Bulletin*, 98, 258.

- [17] Organización Panamericana de la Salud. (2008). Manual para el diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis. Normas y guía técnica. Parte II cultivo.
- [18] Arcturuslabs.com, (2015). Magnifi - Home. Last access: 8 July 2015, from <http://www.arcturuslabs.com>
- [19] SkyLight. (2015). Last access: 8 July 2015, from <http://www.skylightscope.com>
- [20] Snapzoom universal digiscoping adapter, (2015). Home. Last access: 8 July 2015, from <http://snapzooms.com>
- [21] Roy, S., Pantanowitz, L., Amin, M., Seethala, R. R., Ishtiaque, A., Yousem, S. A., ... & Hartman, D. J. (2014). Smartphone adapters for digital photomicrography. *Journal of pathology informatics*, 5.
- [22] Phoneskope.com, (2015). Phone Scope | Digiscoping. Last access: 8 July 2015, from <http://www.phoneskope.com>
- [23] iScope, iScope Hunting, Jeff Foxworthy,. (2015). iScope, iScope Hunting, Jeff Foxworthy. Last access: 8 July 2015, from <http://www.iscope.com>
- [24] s.r.o., M. (2015). MeoPix® iScoping Adapter. Meoptasportsoptics.com. Last access: 8 July 2015, from <http://www.meoptasportsoptics.com/shop/us/4-4s-iscoping-adapter/pxdpgdce72jh/ctgMPus.html>
- [25] Digiscoping.co.uk, (2015). Digiscoping | Adapters. Last access: 8 July 2015, from <http://www.digiscoping.co.uk/?Cat=Adapters>
- [26] Magnicenter.com, (2015). Adaptador para Smartphones | Microscopios y Telescopios | Magnicenter. Last access: 8 July 2015, from <http://www.magnicenter.com/instrumentos/soporte-para-smartphones-mmicroscopios.html>
- [27] impresoras 3d, (2013). ABS y PLA: diferencias, ventajas y desventajas - impresoras 3d. Last access: 8 July 2015, from <http://impresoras3d.com/abs-y-pla-diferencias-ventajas-y-desventajas/>
- [28] Impresoras 3D Granada | Createc 3D, (2014). ABS vs PLA ¿Qué material utilizamos? - Impresoras 3D Granada - Createc 3D. Last access: 8 July 2015, from <http://www.createc3d.com/abs-vs-pla-que-material-utilizamos/>
- [29] Ultimaker.com, (2015). Cura - 3D Printing Slicing Software | Ultimaker. Last access: 8 July 2015, from <https://ultimaker.com/en/products/cura-software>
- [30] Thingiverse.com, (2013). Universal Camera Phone/Microscope Adapter by Ggoss. Last access: 8 July 2015, from <http://www.thingiverse.com/thing:78071>
- [31] Kyriakou, H., Englehardt, S., & Nickerson, J. V. (2014). Networks of innovation in 3D printing. *Howe School Research Paper*, (2014-38).
- [32] Foundation, B. (2015). blender.org - Home of the Blender project - Free and Open 3D Creation Software. blender.org. Last access: 8 July 2015, from <https://www.blender.org/>
- [33] Paintnet.es,. (2015). Paintnet.es. Last access: 8 July 2015, from <http://paintnet.es/>
- [34] Gimp.org, (2015). GIMP - The GNU Image Manipulation Program. Last access: 8 July 2015, from <http://www.gimp.org/>
- [35] Es.mathworks.com, (2015). MATLAB - The Language of Technical Computing. Last access: 8 July 2015, from <http://es.mathworks.com/products/matlab/>

- [36] Camerafv5.com, (2015). Camera FV-5: professional camera application for Android. Last access: 8 July 2015, from <http://www.camerafv5.com/>
- [37] Digitalfotored.com, (2015). Resolución de una imagen: El número de píxeles. Last access: 8 July 2015, from <http://www.digitalfotored.com/imagendigital/numeropixeles.htm>
- [38] Mansurov, N. (2015). Photography Life. Photography Life. Last access: 8 July 2015, from <https://photographylife.com>
- [39] Weetjens, B. J., Mgode, G. F., Machang'u, R. S., Kazwala, R., Mfinanga, G., Lwilla, F., ... & Verhagen, R. (2009). African pouched rats for the detection of pulmonary tuberculosis in sputum samples. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 13(6), 737-743.
- [40] Martínez, A. (2015). Desarrollo de sistemas híbridos de análisis de imagen médica combinando algoritmos automáticos y crowdsourcing. Trabajo de Fin de Máster, Universidad Politécnica de Madrid.
- [41] Munoz, J., Rojo-Marcos, G., Ramírez-Olivencia, G., Salas-Coronas, J., Trevino, B., Arellano, J. L. P., ... & Bassat, Q. (2014). Diagnóstico y tratamiento de la malaria importada en España: recomendaciones del grupo de trabajo de malaria de la Sociedad Española de Medicina Tropical y Salud Internacional (SEMTSI). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*.
- [42] Cybulski, J. S., Clements, J., & Prakash, M. (2014). Foldscope: origami-based paper microscope.
- [43] Sung, Y. L., Jeang, J., Lee, C. H., & Shih, W. C. (2015). Fabricating optical lenses by inkjet printing and heat-assisted in situ curing of polydimethylsiloxane for smartphone microscopy. *Journal of biomedical optics*, 20(4), 047005-047005.
- [44] Keeploop.com, (2015). Microscope for Mobile, camera microscope, portable mini microscope. Last access: 8 July 2015, from <http://www.keeploop.com/>
- [45] Zhu, H., Yaglidere, O., Su, T. W., Tseng, D., & Ozcan, A. (2011). Cost-effective and compact wide-field fluorescent imaging on a cell-phone. *Lab on a Chip*, 11(2), 315-322.
- [46] Mudanyali, O., Tseng, D., Oh, C., Isikman, S. O., Sencan, I., Bishara, W., ... & Ozcan, A. (2010). Compact, light-weight and cost-effective microscope based on lensless incoherent holography for telemedicine applications. *Lab on a Chip*, 10(11), 1417-1428.
- [47] Smith, Z. J., Chu, K., Espenson, A. R., Rahimzadeh, M., Gryshuk, A., Molinaro, M., ... & Wachsmann-Hogiu, S. (2011). Cell-phone-based platform for biomedical device development and education applications. *PLoS one*, 6(3), e17150.
- [48] Mudanyali, O., Dimitrov, S., Sikora, U., Padmanabhan, S., Navruz, I., & Ozcan, A. (2012). Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone. *Lab on a Chip*, 12(15), 2678-2686.
- [49] Skandarajah, A., Reber, C. D., Switz, N. A., & Fletcher, D. A. (2014). Quantitative imaging with a mobile phone microscope.
- [50] Kalinski, T., Zwönitzer, R., Sel, S., Evert, M., Guenther, T., Hofmann, H., ... & Roessner, A. (2008). Virtual 3D microscopy using multiplane whole slide images in diagnostic pathology. *American journal of clinical pathology*, 130(2), 259-264.
- [51] Mateos Pérez, J. M., Redondo, R., Nava, R., Valdiviezo, J. C., Cristóbal, G., Escalante Ramírez, B., ... & Desco, M. (2012). Comparative evaluation of autofocus algorithms for a realtime system for automatic detection of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cytometry Part A*, 81(3), 213-221.